

# **Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)**

International application number: PCT/JP05/006163

International filing date: 30 March 2005 (30.03.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP  
Number: 2004-106315  
Filing date: 31 March 2004 (31.03.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 20 May 2005 (20.05.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland  
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

日本国特許庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日 Date of Application: 2004年 3月31日

出願番号 Application Number: 特願2004-106315

パリ条約による外国への出願に用いる優先権の主張の基礎となる出願の国コードと出願番号

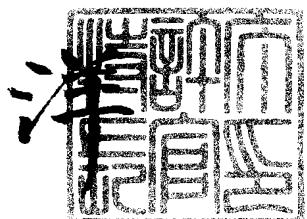
The country code and number of your priority application, to be used for filing abroad under the Paris Convention, is

出願人 Applicant(s): 第一製薬株式会社

2005年 4月27日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

小川



【書類名】 特許願  
【整理番号】 NP04-1026  
【あて先】 特許庁長官殿  
【国際特許分類】 A61P 35/00  
C12N 15/09  
A01K 67/27

【発明者】  
【住所又は居所】 東京都多摩市貝取1493-1 シャロンパーク永山604  
【氏名】 秋山 徹

【発明者】  
【住所又は居所】 東京都北区西ヶ原2-20-7-105  
【氏名】 石田尾 武文

【発明者】  
【住所又は居所】 新潟県新井市中央町10-9  
【氏名】 相羽 智生

【特許出願人】  
【識別番号】 000002831  
【氏名又は名称】 第一製薬株式会社

【代理人】  
【識別番号】 100088904  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 庄司 隆  
【電話番号】 03-3864-6572

【手数料の表示】  
【予納台帳番号】 067070  
【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】  
【物件名】 特許請求の範囲 1  
【物件名】 明細書 1  
【物件名】 図面 1  
【物件名】 要約書 1

**【書類名】特許請求の範囲**

**【請求項 1】**

D1g (discs large)によるsFRP (secreted frizzled-related protein)の発現および／または機能を、増強する作用を有する化合物を含む抗腫瘍剤。

**【請求項 2】**

D1g (discs large)によるsFRP (secreted frizzled-related protein)の発現および／または機能を、増強する作用を有する化合物が、D1gの発現増強剤および／または機能増強剤である請求項1に記載の抗腫瘍剤。

**【請求項 3】**

D1g (discs large)によるsFRP (secreted frizzled-related protein)の発現および／または機能を、増強する作用を有する化合物が、D1g、D1g遺伝子およびD1g遺伝子を含有する組換えベクターのうちの少なくとも1つである請求項1に記載の抗腫瘍剤。

**【請求項 4】**

sFRP (secreted frizzled-related protein)が、sFRP2である請求項1から3のいずれか1項に記載の抗腫瘍剤。

**【請求項 5】**

D1g (discs large)の発現および／または機能を増強する作用を有する化合物を含むsFRP (secreted frizzled-related protein)の発現増強剤および／または機能増強剤。

**【請求項 6】**

D1g (discs large)の発現および／または機能を増強する作用を有する化合物が、D1g、D1g遺伝子およびD1g遺伝子を含有する組換えベクターのうちの少なくとも1つである請求項5に記載のsFRP (secreted frizzled-related protein)の発現増強剤および／または機能増強剤。

**【請求項 7】**

sFRP (secreted frizzled-related protein)が、sFRP2である請求項5または6に記載のsFRPの発現増強剤および／または機能増強剤。

**【請求項 8】**

D1g (discs large)によるsFRP (secreted frizzled-related protein)の発現および／または機能を、増強する作用を有する化合物を含む腫瘍疾患の防止剤および／または治療剤。

**【請求項 9】**

D1g (discs large)によるsFRP (secreted frizzled-related protein)の発現および／または機能を、増強する作用を有する化合物が、D1gの発現増強剤および／または機能増強剤である請求項8に記載の腫瘍疾患の防止剤および／または治療剤。

**【請求項 10】**

D1g (discs large)によるsFRP (secreted frizzled-related protein)の発現および／または機能を、増強する作用を有する化合物が、D1g、D1g遺伝子およびD1g遺伝子を含有する組換えベクターのうちの少なくとも1つである請求項8に記載の腫瘍疾患の防止剤および／または治療剤。

**【請求項 11】**

sFRP (secreted frizzled-related protein)が、sFRP2である請求項8から10のいずれか1項に記載の腫瘍疾患の防止剤および／または治療剤。

**【請求項 12】**

D1g (discs large) による sFRP (secreted frizzled-related protein) の発現および／または機能を、増強することを特徴とする腫瘍形成阻害方法。

【請求項 13】

D1g の発現増強剤および／または機能増強剤を用いることを特徴とする、請求項 12 に記載の腫瘍形成阻害方法。

【請求項 14】

D1g (discs large)、D1g 遺伝子および D1g 遺伝子を含有する組換えベクターのうちの少なくとも 1 つを用いることを特徴とする請求項 12 に記載の腫瘍形成阻害方法。

【請求項 15】

sFRP (secreted frizzled-related protein) が、sFRP 2 である請求項 12 から 14 のいずれか 1 項に記載の腫瘍形成阻害方法。

【請求項 16】

D1g (discs large) の発現および／または機能を増強することを特徴とする、sFRP (secreted frizzled-related protein) の発現増強方法および／または機能増強方法。

【請求項 17】

D1g (discs large)、D1g 遺伝子および D1g 遺伝子を含有する組換えベクターのうちの少なくとも 1 つを用いることを特徴とする請求項 16 に記載の sFRP (secreted frizzled-related protein) の発現増強方法および／または機能増強方法。

【請求項 18】

sFRP (secreted frizzled-related protein) が、sFRP 2 である請求項 16 または 17 に記載の sFRP の発現増強方法および／または機能増強方法。

【請求項 19】

D1g (discs large) による sFRP (secreted frizzled-related protein) の発現および／または機能を、増強することを特徴とする、腫瘍疾患の防止方法および／または治療方法。

【請求項 20】

D1g (discs large) の発現増強剤および／または機能増強剤を用いることを特徴とする請求項 19 に記載の腫瘍疾患の防止方法および／または治療方法。

【請求項 21】

D1g (discs large)、D1g 遺伝子および D1g 遺伝子を含有する組換えベクターのうちの少なくとも 1 つを用いることを特徴とする請求項 19 に記載の腫瘍疾患の防止方法および／または治療方法。

【請求項 22】

sFRP (secreted frizzled-related protein) が、sFRP 2 である請求項 19 から 21 のいずれか 1 項に記載の腫瘍疾患の防止方法および／または治療方法。

【請求項 23】

D1g (discs large) 対立遺伝子の一方が欠損した非ヒト哺乳動物を用いることを特徴とする、下記いずれかの化合物の同定方法；

(i) 肿瘍形成を阻害する化合物、

(ii) D1g の発現および／または機能を増強する作用を有する化合物、および

(iii) sFRP (secreted frizzled-related protein) の発現および／または機能を増強する作用を有する化合物。

【請求項 24】

D1g (d i s c s l a r g e) 対立遺伝子の一方または両方が欠損した非ヒト哺乳動物由来の細胞を用いることを特徴とする、下記いずれかの化合物の同定方法；

(i) D1g の発現および／または機能を増強する作用を有する化合物、

(ii) sFRP (s e c r e t e d f r i z z l e d - r e l a t e d p r o t e i n ) の発現および／または機能を増強する作用を有する化合物、

および

(iii) sFRP のメチル化を阻害する作用および／または脱メチル化する作用を有する化合物。

【請求項25】

sFRP (s e c r e t e d f r i z z l e d - r e l a t e d p r o t e i n ) が、sFRP 2 である請求項23 または24 に記載の化合物の同定方法。

【請求項26】

D1g (d i s c s l a r g e) 対立遺伝子の一方または両方が欠損した非ヒト哺乳動物。

【請求項27】

D1g (d i s c s l a r g e) 対立遺伝子の一方または両方が欠損した非ヒト哺乳動物由来の細胞。

【請求項28】

被検組織または被検細胞中のD1g (d i s c s l a r g e) 遺伝子および／またはD1g の発現および／または機能を測定し、正常組織または正常細胞と比較して該発現および／または該機能の低下または消失を検出することを特徴とする、腫瘍組織または腫瘍細胞の検査方法。

【書類名】明細書

【発明の名称】sFRP 発現増強剤

【技術分野】

【0001】

本発明は、D1g (discs large) による sFRP (secreted frizzled-related protein) の発現および/または機能を、増強する作用を有する化合物を含む抗腫瘍剤に関する。また、D1g の発現および/または機能を増強する作用を有する化合物を含む sFRP の発現増強剤および/または機能増強剤に関する。さらに、D1g による sFRP の発現および/または機能を、増強する作用を有する化合物を含む腫瘍疾患の防止剤および/または治療剤に関する。また、D1g による sFRP の発現および/または機能を、増強することを特徴とする腫瘍形成阻害方法に関する。さらに、D1g の発現および/または機能を増強することを特徴とする、sFRP の発現増強方法および/または機能増強方法に関する。また、D1g による sFRP の発現および/または機能を、増強することを特徴とする、腫瘍疾患の防止方法および/または治療方法に関する。さらに、D1g 対立遺伝子の一方が欠損した非ヒト哺乳動物を用いることを特徴とする、化合物の同定方法に関する。また、D1g 対立遺伝子の一方または両方が欠損した非ヒト哺乳動物由来の細胞を用いることを特徴とする、化合物の同定方法に関する。さらに、D1g 対立遺伝子の一方または両方が欠損した非ヒト哺乳動物に関する。また、該非ヒト哺乳動物由来の細胞に関する。さらに、D1g 遺伝子および/または D1g の発現および/または機能を測定することを特徴とする、腫瘍組織または腫瘍細胞の検査方法に関する。

【背景技術】

【0002】

D1g (discs large) 遺伝子は、数々の組織や細胞で普遍的に発現が認められている遺伝子である。D1g 遺伝子によりコードされる蛋白質（以下、D1g と呼称する）は、APC (adenomatous polyposis coli) の C 末端 XVT モチーフに結合することが報告されている（非特許文献 1）。APC 遺伝子は、家族性腺腫性ポリポーシス (familial adenomatous polyposis : FAP) の原因遺伝子として単離された。APC 遺伝子は FAP だけでなく、散発性の大腸癌についても多数の症例でその異常が検出されている。このことから、APC 遺伝子の異常は大腸癌発症の重要な要因であると考えられる。APC 遺伝子によりコードされる蛋白質（以下、APC と呼称する）は 300 kDa の巨大な蛋白質で、 $\beta$ -カテニンと複合体を形成し、Wnt/Wingless シグナル（以下、Wnt シグナルと呼称する）伝達経路を負に制御している。また、APC の過剰発現は細胞周期の進行を阻害する。D1g と APC の発現がラット大腸上皮細胞および培養海馬ニューロンのシナプスと共に認められたことから、D1g と APC の複合体は、細胞周期の進行およびニューロン機能に寄与していると考えられる。

【0003】

Wnt シグナルは、形態形成を制御する情報伝達系として見出され、発生、幹細胞分化制御および細胞癌化等の様々な現象に関わることが知られている。最近、Wnt シグナルが、幹細胞の増殖調節および生存に重要な因子であることが報告された（非特許文献 2 および 3）。Wnt シグナルは、Wnt リガンドにより細胞膜上に存在するフリズルドメンブレンレセプター (frizzled membrane receptor; 以下、Fz と略称する) を介して伝達される。近年、Fz および Wnt に結合する分泌型フリズルド関連蛋白質 (secreted frizzled-related protein; 以下、sFRP と略称する) が見い出された（非特許文献 4）。sFRP は細胞外において Fz および Wnt に結合して、Wnt シグナルのアンタゴニストとして作用し、Wnt シグナルの調節に関わっていると考えられる（非特許文献 5）。また、sFRP の機能を大腸癌細胞において回復させることにより該細胞内の Wnt シグナルが低減されたこと、および大腸癌細胞においては sFRP 遺伝子のメチル化により sFRP の機能が低下

していることが報告されている（非特許文献6）。

#### 【0004】

【非特許文献1】マツミネ（Matsumine, A）ら、「サイエンス（Science）」、1996年、第272巻、p. 1020-1023。

【非特許文献2】ウィラート（Willert, K）ら、「ネイチャー（Nature）」、2003年、第423巻、p. 448-452。

【非特許文献3】ルヤ（Reya, T）ら、「ネイチャー（Nature）」、2003年、第423巻、p. 409-414。

【非特許文献4】カワノ（Kawano, Y）ら、「ジャーナル オブ セル サイエンス（Journal of Cell Science）」、2003年、第116巻、p. 2627-2634。

【非特許文献5】ジョーンズ（Jones, S. E.）ら、「バイオエッセイズ（BioEssays）」、2002年、第24巻、p. 811-820。

【非特許文献6】スズキ（Suzuki, H）ら、「ネイチャー ジェネティクス（Nature Genetics）」、2004年3月14日オンライン公開。

#### 【発明の開示】

##### 【発明が解決しようとする課題】

###### 【0005】

D1g遺伝子は、ショウジョウバエにおいてその欠損により神経芽細胞腫を形成することが報告されていることから、癌抑制遺伝子であると考えられている。また、D1gがAPCと結合することや、APCが腫瘍形成に関わるWntシグナルの調節に関与していることから、D1gのWntシグナルへの関与が考えられる。しかしながら、哺乳動物においてD1g遺伝子が癌抑制遺伝子として作用することを明らかにした報告はない。また、D1gのWntシグナルへの関与についての報告もない。

###### 【0006】

D1gの作用およびその作用メカニズムを哺乳動物において明らかにし、その作用を調節する手段を提供することは、D1g遺伝子、D1gおよびこれらの発現や機能の異常に起因する疾患の防止手段または治療手段の開発に有用である。

###### 【0007】

本発明においては、D1gの作用を調節する手段の提供を課題とする。また、D1g遺伝子の異常に起因する疾患の防止手段または治療手段を提供することを課題とする。

##### 【課題を解決するための手段】

###### 【0008】

上記課題を解決すべく本発明者らは銳意努力し、D1g遺伝子ノックアウトマウスを遺伝子工学的手法により作製した。そして、D1g遺伝子ヘテロ欠損マウスにおいて腫瘍が形成されること、および腫瘍形成にD1g遺伝子欠損が重要な因子であることを見い出した。さらに、D1g遺伝子欠損により、sFRP1遺伝子およびsFRP2遺伝子の転写が低減することを見出し、これら知見により本発明を完成するに至った。

###### 【0009】

すなわち、本発明は、

1. D1g (discs large) によるsFRP (secreted frizzled-related protein) の発現および／または機能を、増強する作用を有する化合物を含む抗腫瘍剤、

2. D1g (discs large) によるsFRP (secreted frizzled-related protein) の発現および／または機能を、増強する作用を有する化合物が、D1gの発現増強剤および／または機能増強剤である前記1. の抗腫瘍剤、

3. D1g (discs large) によるsFRP (secreted frizzled-related protein) の発現および／または機能を、増強する作用を有する化合物が、D1g、D1g遺伝子およびD1g遺伝子を含有する組換えベクタ

ーのうちの少なくとも1つである前記1. の抗腫瘍剤、

4. sFRP (secreted frizzled-related protein) が、sFRP2 である前記1. から3. のいずれかの抗腫瘍剤、

5. D1g (discs large) の発現および／または機能を増強する作用を有する化合物を含むsFRP (secreted frizzled-related protein) の発現増強剤および／または機能増強剤、

6. D1g (discs large) の発現および／または機能を増強する作用を有する化合物が、D1g、D1g 遺伝子およびD1g 遺伝子を含有する組換えベクターのうちの少なくとも1つである前記5. のsFRP (secreted frizzled-related protein) の発現増強剤および／または機能増強剤、

7. sFRP (secreted frizzled-related protein) が、sFRP2 である前記5. または6. のsFRP の発現増強剤および／または機能増強剤、

8. D1g (discs large) によるsFRP (secreted frizzled-related protein) の発現および／または機能を、増強する作用を有する化合物を含む腫瘍疾患の防止剤および／または治療剤、

9. D1g (discs large) によるsFRP (secreted frizzled-related protein) の発現および／または機能を、増強する作用を有する化合物が、D1g の発現増強剤および／または機能増強剤である前記8. の腫瘍疾患の防止剤および／または治療剤、

10. D1g (discs large) によるsFRP (secreted frizzled-related protein) の発現および／または機能を、増強する作用を有する化合物が、D1g、D1g 遺伝子およびD1g 遺伝子を含有する組換えベクターのうちの少なくとも1つである前記8. の腫瘍疾患の防止剤および／または治療剤、

11. sFRP (secreted frizzled-related protein) が、sFRP2 である前記8. から10. のいずれかの腫瘍疾患の防止剤および／または治療剤、

12. D1g (discs large) によるsFRP (secreted frizzled-related protein) の発現および／または機能を、増強することを特徴とする腫瘍形成阻害方法、

13. D1g の発現増強剤および／または機能増強剤を用いることを特徴とする、前記12. の腫瘍形成阻害方法、

14. D1g (discs large) 、D1g 遺伝子およびD1g 遺伝子を含有する組換えベクターのうちの少なくとも1つを用いることを特徴とする前記12. の腫瘍形成阻害方法、

15. sFRP (secreted frizzled-related protein) が、sFRP2 である前記12. から14. のいずれかの腫瘍形成阻害方法、

16. D1g (discs large) の発現および／または機能を増強することを特徴とする、sFRP (secreted frizzled-related protein) の発現増強方法および／または機能増強方法、

17. D1g (discs large) 、D1g 遺伝子およびD1g 遺伝子を含有する組換えベクターのうちの少なくとも1つを用いることを特徴とする前記16. のsFRP (secreted frizzled-related protein) の発現増強方法および／または機能増強方法、

18. sFRP (secreted frizzled-related protein) が、sFRP2 である前記16. または17. のsFRP の発現増強方法および／または機能増強方法、

19. D1g (discs large) によるsFRP (secreted frizzled-related protein) の発現および／または機能を、増強することを特徴とする、腫瘍疾患の防止方法および／または治療方法、

20. D1g (discs large) の発現増強剤および／または機能増強剤を用いることを特徴とする前記19. の腫瘍疾患の防止方法および／または治療方法、

21. D1g (discs large) 、D1g遺伝子およびD1g遺伝子を含有する組換えベクターのうちの少なくとも1つを用いることを特徴とする前記19. の腫瘍疾患の防止方法および／または治療方法、

22. sFRP (secreted frizzled-related protein) が、sFRP2である前記19. から21. のいずれかの腫瘍疾患の防止方法および／または治療方法、

23. D1g (discs large) 対立遺伝子の一方が欠損した非ヒト哺乳動物を用いることを特徴とする、下記いずれかの化合物の同定方法；

(i) 腫瘍形成を阻害する化合物、

(ii) D1gの発現および／または機能を増強する作用を有する化合物、  
および

(iii) sFRP (secreted frizzled-related protein) の発現および／または機能を増強する作用を有する化合物、

24. D1g (discs large) 対立遺伝子の一方または両方が欠損した非ヒト哺乳動物由来の細胞を用いることを特徴とする、下記いずれかの化合物の同定方法；

(i) D1gの発現および／または機能を増強する作用を有する化合物、

(ii) sFRP (secreted frizzled-related protein) の発現および／または機能を増強する作用を有する化合物、  
および

(iii) sFRPのメチル化を阻害する作用および／または脱メチル化する作用を有する化合物、

25. sFRP (secreted frizzled-related protein) が、sFRP2である前記23. または24. の化合物の同定方法、

26. D1g (discs large) 対立遺伝子の一方または両方が欠損した非ヒト哺乳動物、

27. D1g (discs large) 対立遺伝子の一方または両方が欠損した非ヒト哺乳動物由来の細胞、

28. 被検組織または被検細胞中のD1g (discs large) 遺伝子および／またはD1gの発現および／または機能を測定し、正常組織または正常細胞と比較して該発現および／または該機能の低下または消失を検出することを特徴とする、腫瘍組織または腫瘍細胞の検査方法、  
に関する。

### 【発明の効果】

#### 【0010】

本発明により、抗腫瘍剤、sFRPの発現増強剤および／または機能増強剤、並びに腫瘍疾患の防止剤および／または治療剤の提供が可能である。これら薬剤を用いて腫瘍疾患の防止および治療が達成できる。該抗腫瘍剤並びにsFRPの発現増強剤および／または機能増強剤は、D1gによるsFRPの発現および／または機能のメカニズム解明並びにD1gの欠損による腫瘍形成のメカニズム解明に利用できる。また、本発明において提供するD1g欠損非ヒト哺乳動物および該哺乳動物由来の細胞の使用により、抗腫瘍剤、sFRPの発現増強剤および／または機能増強剤、sFRP遺伝子のメチル化阻害剤および／または脱メチル化剤、並びに腫瘍疾患の防止剤および／または治療剤に用い得る化合物の同定方法が実施可能になる。

### 【発明を実施するための最良の形態】

#### 【0011】

以下、本発明について発明の実施の態様をさらに詳しく説明する。

本発明においては、D1g遺伝子ノックアウトマウスを遺伝子工学的手法により作製した（実施例1参照）。そして、D1gの発現低下および／または機能低下が腫瘍形成の重

要な要因であることを、哺乳動物において初めて明らかにした。

#### 【0012】

本明細書および特許請求の範囲において、「D1g遺伝子ノックアウトマウス」とは、個体においてD1g遺伝子のみを欠損させたマウスをいう。「D1g」とは、D1g蛋白質を意味し、「D1g遺伝子」とは、D1gをコードする遺伝子を指す。「D1gの発現」とは、D1gをコードするDNAの遺伝子情報がmRNA(D1g mRNA)に転写されること、または、mRNAに転写され、かつ蛋白質(D1g)のアミノ酸配列として翻訳されることをいう。

#### 【0013】

D1g遺伝子ノックアウトマウスのうち、D1g遺伝子ホモ欠損マウス(以下、D1g-/マウスと呼称する)は、生後短期間で死亡するために成熟マウスを得られなかつたが、胚および新生児マウスが得られた。D1g-/マウスでは、D1gが検出されなかつた。D1g-/マウスでは、D1g対立遺伝子の両方が欠損していることにより、D1g遺伝子の転写が起きず、その結果、D1gのアミノ酸配列が翻訳されない。D1gが発現されないことから、D1g-/マウスでは、D1gの機能は消失している。一方、D1g遺伝子ヘテロ欠損マウス(以下、D1g+/マウスと呼称する)については、胚、新生児マウスおよび成熟マウスが得られた。D1g+/マウスでは、D1gが検出されたが、その量は野生型マウス(以下、D1g+/+マウスと呼称する)と比較して少なかつた。

#### 【0014】

D1g+/マウスにおいては、成長に伴つて、皮膚腫瘍およびナチュラルキラーリンバ腫の形成が認められた。形成された腫瘍を含む皮膚組織において、正常筋細胞でD1gが検出されたが、腫瘍細胞ではD1gが検出されなかつた。このことから、D1g+/マウスにおける腫瘍形成は、D1g遺伝子の欠損によるD1gの発現低下および/または機能低下に起因すると考えられる。あるいは、該マウスにおいては対立遺伝子の一方が欠損していることにより、成熟過程でD1g遺伝子の自然変異誘発等が起こり易く、そのためD1gの発現異常が生じて腫瘍が形成される可能性も考えられる。

#### 【0015】

また、D1g-/マウスから採取したマウス胚性線維芽細胞(以下、MEFと略称する)において、sFRP1 mRNAおよびsFRP2 mRNAの減少が認められた。特にsFRP2 mRNAが著しく減少していた。D1g-/マウス由来のMEFにD1g遺伝子を導入して発現させると、sFRP2 mRNAが増加することが判明した。このことから、D1g-/マウス由来のMEFにおけるmRNAの減少は、D1g遺伝子の欠損によると考える。mRNAの減少は、mRNAから翻訳されて生じる蛋白質の減少を惹き起こし、その結果、生体内における該蛋白質の機能も低下させる。これらから、D1gの発現低下および/または機能低下は、sFRPの発現、特にsFRP2の発現および/または機能の低下を惹き起すと考える。sFRPは、Wntアンタゴニストとしての機能を有し、Wntシグナルの調節機能を担っていることが知られている(「ディベロブメント(Development)」、1998年、第125巻、p.4767-4776;および「ヒューマン モレキュラー ジェネティクス(Human Molecular Genetics)」、1999年、第8巻、p.575-583)。最近、sFRP2等のsFRPファミリーの機能を大腸癌細胞において回復させることにより、Wntシグナルが低減されることが報告された(スズキ(Suzuki, H)ら、「ネイチャージェネティクス(Nature Genetics)」、2004年3月14日オンライン公開)。さらに、この報告においては、sFRP遺伝子のメチル化が多数の大腸癌組織で認められることを開示している。これらから、大腸癌形成において、sFRP遺伝子のメチル化によりsFRPの発現および/または機能が低下し、その結果Wntシグナル伝達経路が活性化するというメカニズムが存在することが示唆された。癌細胞のゲノムDNA中に多くのDNAメチル化が観察されることは既に報告されており、発癌とDNAメチル化との関連性が指摘されている。DNAメチル化は、DNAメチルトランスフェ

ラーゼによりDNA中のシトシン塩基にメチル基が付加されて5-メチルシトシンが生じる反応である。メチル化されたDNAにはメチル化DNAに特異的に結合する蛋白質(MBP蛋白質)が結合し、さらにヒストン脱アセチル化酵素を含む転写リプレッサーとの複合体が形成されてヒストンが脱アセチル化するため、クロマチンの構造変化が起こり転写が抑制される。また、MBP蛋白質の結合により、メチル化DNAからの脱メチル化が妨げられてメチル化状態が維持され、転写が安定的に阻止される。すなわち、DNAメチル化は、遺伝子の転写のスイッチとしての作用を有している。例えば、癌抑制遺伝子がメチル化されると、その転写が抑制されるため、癌遺伝子の転写が惹き起こされる可能性がある。また、通常はメチル化されて転写が抑制されている癌遺伝子のメチル化が解除されると、癌遺伝子の転写が開始される可能性がある。

#### 【0016】

sFRPがWntシグナルの調節機能を担っていることから、D1g遺伝子欠損による腫瘍形成のメカニズムには、D1gの発現低下および/または機能低下により、sFRPの発現および/または機能が阻害され、その結果Wntシグナルが促進されるというカスケードが存在すると考える。すなわち、D1gは、sFRPによって調節されているWntシグナル伝達経路の上流に位置する因子であり、sFRPの発現および/または機能によりWntシグナルを負に調節すると考える。したがって、D1gは、Wntシグナルの活性化による腫瘍形成を阻害すると考える。D1gによるsFRPの発現および/または機能に関わるメカニズムとして、D1gによる、sFRPの発現に関与する転写因子や転写調節因子の調節が考えられる。また、別のメカニズムとして、D1gによる、sFRP遺伝子のメチル化の調節が考えられる。例えば、D1gにより、sFRP遺伝子のメチル化に関与するDNAメチルトランスフェラーの作用が阻害され、その結果、sFPPの発現および/または機能が正常な状態に維持されるといったメカニズムが考えられる。

#### 【0017】

このように、D1gの発現低下および/または機能低下により、sFRPの発現および/または機能が阻害され、その結果、Wntシグナルが促進されて腫瘍が形成される。sFRPの発現および/または機能の阻害は、D1gの発現低下および/または該発現低下に起因するD1gの機能低下のみならず、D1g遺伝子の変異や該遺伝子の転写・翻訳過程の異常、あるいは蛋白質修飾過程の異常等に起因するD1gの機能低下によっても惹き起こされる。

#### 【0018】

したがって、D1gによるsFRPの発現および/または機能、好ましくはD1gによるsFRP2の発現および/または機能を、増強することにより、Wntシグナルを介した細胞増殖および腫瘍形成を阻害できると考える。さらには、D1gによるsFRPの発現および/または機能、好ましくはD1gによるsFRP2の発現および/または機能を、増強することにより、Wntシグナルの活性化に起因する疾患、例えば腫瘍疾患の防止および/または治療が可能である。本明細書および特許請求の範囲において、「sFRPの発現」とは、sFRPをコードするDNAの遺伝子情報がmRNA(sFRP-mRNA)に転写されること、または、mRNAに転写され、かつ蛋白質(sFRP)のアミノ酸配列として翻訳されることを意味する。「sFRPの機能」としては、例えはWntシグナルアンタゴニストとして、Wntシグナル伝達経路を負に調節する機能が例示できる。「D1gによるsFRPの発現および/または機能を増強する」とは、D1gによるsFRPの発現および/または機能がほとんど認められない状態から、該発現および/または機能が認められる状態に変化させること、並びに該発現および/または機能が認められる状態から、その発現量および/または機能がさらに増加した状態に変化させることのいずれをも意味する。「Wntシグナルの活性化」とは、Wntシグナルの作動の程度が正常な状態と比較して高く変化することをいう。Wntシグナルの作動の程度が高く変化することにより、細胞増殖や腫瘍形成等が惹き起こされる。

#### 【0019】

D1gによるsFRPの発現および/または機能、好ましくはD1gによるsFRP2

の発現および／または機能を、増強することは、例えば、D1gの発現および／または機能を増強することにより実施可能である。D1gの機能としては、sFRPの発現および／または機能に関わるメカニズムの調節作用が挙げられる。例えば、D1gの機能としてsFRP遺伝子の転写因子や転写調節因子の機能の増強や、sFRP遺伝子のメチル化の阻害等が考えられる。D1gの発現および／または機能を増強することにより、sFRP遺伝子の転写因子や転写調節因子の機能の増強またはsFRP遺伝子のメチル化の阻害等を介して、sFRPの発現および／または機能を増強することができる。具体的には、sFRPの発現および／または機能を増強することは、D1gによるsFRPの発現および／または機能を、増強する作用を有する化合物により実施可能である。このような化合物として、D1g自体またはD1g遺伝子若しくはD1g遺伝子を含有する組換えベクターを例示できる。あるいはD1gの発現増強剤および／または機能増強剤を用いて実施することができる。D1gによるsFRPの発現を、増強する作用を有する化合物は、後述する化合物の同定方法により、種々の化合物から当該作用を有する化合物を選別することにより取得できる。また、D1gの発現増強剤および／または機能増強剤の有効成分として用い得る化合物は、後述する化合物の同定方法により、種々の化合物からD1gの発現および／または機能を増強する化合物を選別することにより取得できる。このように、D1gによるsFRPの発現および／または機能を、増強する作用を有する化合物を用いて、sFRPの発現および／または機能を増強することにより、Wntシグナルを介した細胞増殖および腫瘍形成の阻害、腫瘍疾患の防止および／または治療が可能である。

#### 【0020】

本発明においては、D1gによるsFRPの発現および／または機能を、増強する作用を有する化合物を含む抗腫瘍剤、D1gの発現および／または機能を増強する作用を有する化合物を含むsFRPの発現増強剤および／または機能増強剤、D1gによるsFRPの発現および／または機能を、増強する作用を有する化合物を含む腫瘍疾患の防止剤および／または治療剤を提供する。以下、本発明において、sFRPとして、好ましくはsFRP2である。また、D1gによるsFRPの発現および／または機能を、増強することを特徴とする腫瘍形成阻害方法、D1gの発現および／または機能を増強することを特徴とするsFRPの発現増強方法および／または機能増強方法、D1gによるsFRPの発現および／または機能を、増強することを特徴とする腫瘍疾患の防止方法および／または治療方法を提供可能である。これら方法は、上記抗腫瘍剤、sFRP発現増強剤および／または機能増強剤、並びに腫瘍疾患の防止剤および／または治療剤のいずれかを使用して実施可能である。

#### 【0021】

D1gとしては、哺乳動物、例えば、ヒト、マウス、ラット等のあらゆる組織または細胞等に由来する蛋白質が挙げられる。具体的には例えば、配列表の配列番号2に記載のアミノ酸配列で表されるヒト由来蛋白質、あるいは配列番号4に記載のアミノ酸配列で表わされるマウス由来蛋白質が好ましく例示できる。D1gは配列番号2または4に記載のアミノ酸配列で表される蛋白質に限定されず、該アミノ酸配列を含む蛋白質、または該アミノ酸配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、さらに好ましくは約95%以上の相同性を有するアミノ酸配列で表される蛋白質ができる。あるいは、該アミノ酸配列において1乃至数個のアミノ酸に置換、欠失、付加または挿入等の変異が存するアミノ酸配列で表される蛋白質であり得る。これら蛋白質は、D1gとしての機能を有する蛋白質、例えば、sFRP、好ましくはsFRP2の発現および／または機能を増強することができる蛋白質であることが好ましい。アミノ酸の変異の程度およびそれらの位置等は、該変異を有する蛋白質が、sFRP、好ましくはsFRP2の発現および／または機能を増強することができる限り特に制限されない。かかる変異を有する蛋白質は、天然において例えば突然変異や翻訳後の修飾等により生じたものであってよく、また天然由来の遺伝子に基づいて変異を導入して得たものであってもよい。変異を導入する方法は自体公知であり、例えば、公知の遺伝子工学的技術を利用して実施できる。変異の導入において、当該蛋白質の基本的な性質（物性、機能、生理活性または

免疫学的活性等)を変化させないという観点からは、例えば、同族アミノ酸(極性アミノ酸、非極性アミノ酸、疎水性アミノ酸、親水性アミノ酸、陽性荷電アミノ酸、陰性荷電アミノ酸および芳香族アミノ酸等)の間での相互の置換は容易に想定される。

## 【0022】

D<sub>1</sub>gは、D<sub>1</sub>gの発現が確認されている哺乳動物由来の組織や細胞から、公知の蛋白質精製方法に従って精製することにより取得できる。このような方法においては、まず、哺乳動物由来の組織や細胞をホモジナイズした後に、酸や有機溶媒等で蛋白質の抽出を行なう。次いで、得られた抽出液から、公知の精製法を利用してD<sub>1</sub>gを単離精製する。単離精製方法としては、例えば硫酸アンモニウム沈殿、限外ろ過、ゲルクロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー、透析法等を単独でまたは適宜組合せて用いることができる。好ましくは、D<sub>1</sub>gまたはその断片を用いて公知の抗体作製法により作製した抗D<sub>1</sub>g特異的抗体を使用して特異的に吸着する方法が推奨される。具体的には、該抗体を結合させたカラムを利用するアフィニティクロマトグラフィーを用いることが好ましい。また、D<sub>1</sub>gは、一般的な化学合成法により製造することができる。蛋白質の化学合成方法として、成書(「ペプチド合成」、丸善株式会社、1975年;および「ペプチドシンテシス(Peptide Synthesis)」、インターライエンス(Interscience)、ニューヨーク(New York)、1996年)に記載の方法が例示されるが、これらに限らず公知の方法が広く利用可能である。具体的には、例えば、固相合成方法、液相合成方法等が知られているがいずれも利用可能である。かかる蛋白質合成法は、より詳しくは、アミノ酸配列情報に基づいて、各アミノ酸を1個ずつ逐次結合させて鎖を延長させていくいわゆるステップワイズエロンゲーション法と、アミノ酸数個からなるフラグメントを予め合成し、次いで各フラグメントをカップリング反応させるフラグメントコンデンセーション法とを包含する。D<sub>1</sub>gの合成は、そのいずれによっても行うことができる。上記蛋白質合成法において利用される縮合法も常法に従うことができる。縮合法として、例えば、アジド法、混合酸無水物法、DCC法、活性エステル法、酸化還元法、DPPA(ジフェニルホスホリルアジド)法、DCC+添加物(1-ヒドロキシベンゾトリアゾール、N-ヒドロキシサクシニアミド、N-ヒドロキシ-5-ノルボルネン-2,3-ジカルボキシイミド等)法、ウッドワード法等が例示できる。化学合成により得られるD<sub>1</sub>gはさらに、上記のような慣用の各種精製方法により適宜精製を行うことができる。あるいは、D<sub>1</sub>gは、D<sub>1</sub>g遺伝子の塙基配列情報に基づいて一般的遺伝子工学的手法(村松正實編、「ラボマニュアル遺伝子工学」、1988年、丸善株式会社;エールリッヒ(Ehrlich, H. A.)編、「PCRテクノロジー、DNA增幅の原理と応用」、1989年、ストックトンプレス;およびウルマー(Ulmer, K. M.)、「サイエンス(Science)」、1983年、第219巻、p. 666-671等を参照)により取得可能である。例えば、D<sub>1</sub>g遺伝子を含有する組換えベクターを導入した形質転換体を用いてD<sub>1</sub>gの発現誘導を行い、その後該形質転換体からD<sub>1</sub>gを回収することにより、D<sub>1</sub>gを取得できる。さらに、所望により、形質転換体を培養した培養液または形質転換体から、上記単離精製方法によりD<sub>1</sub>gを精製することができる。D<sub>1</sub>g遺伝子を含有する組換えベクターを導入した形質転換体において、D<sub>1</sub>gが形質転換体の細胞内あるいは細胞膜上に発現する場合には、形質転換体を破碎してD<sub>1</sub>gを抽出する。D<sub>1</sub>gが形質転換体外に分泌される場合には、培養液をそのまま使用するか、遠心分離処理等により形質転換体を除去した培養液を用いる。さらに、所望により、形質転換体を培養した培養液または形質転換体から、上記単離精製方法によりD<sub>1</sub>gを精製することができる。また、D<sub>1</sub>g遺伝子を導入した組換えベクターを用いて、公知の無細胞蛋白質発現系を用いて、D<sub>1</sub>gを得ることもできる(マディン(Madlin, K.)ら、「Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America」、2000年、第97巻、p. 559-564)。

### 【0023】

D<sub>1</sub>g遺伝子は、D<sub>1</sub>gの発現が確認されている適当な起源から、常法に従ってcDNAライブラリーを調製し、該cDNAライブラリーから所望のクローンを選択することにより取得可能である。cDNAの起源としては、D<sub>1</sub>gの発現が確認されている各種の細胞や組織、またはこれらに由来する培養細胞を例示できる。D<sub>1</sub>gは種々の組織や細胞で普遍的に発現しているため、cDNAの起源として様々な組織や細胞を使用できる。好ましくは、脳組織、皮膚組織または大腸組織等、あるいはこれら組織由来の細胞等が例示できる。これら起源からcDNAライブラリーを調製するための全RNAの分離、mRNAの分離や精製、cDNAの取得とそのクローニング等はいずれも常法に従って実施可能である。また、ヒトの脳、胎児脳および脳海馬由来の市販されているpolynucleic acid+RNAからcDNAライブラリーを構築して用いることもできる。cDNAライブラリーから所望のクローンを選択する方法も特に制限されず、慣用の方法を利用できる。例えば、D<sub>1</sub>g遺伝子に選択的にハイブリダイゼーションするプローブやプライマー等を用いて所望のクローンを選択することができる。具体的には、D<sub>1</sub>g遺伝子に選択的にハイブリダイゼーションするプローブを用いたプラーカハイブリダイゼーション法、コロニーハイブリダイゼーション法等やこれらを組合せた方法等を例示できる。ここで用いるプローブやプライマーとしては、D<sub>1</sub>g遺伝子の配列情報に基づいて化学合成したポリヌクレオチド等が一般的に使用できる。D<sub>1</sub>g遺伝子として具体的には例えば、配列表の配列番号1に記載の塩基配列で表されるヒト由来DNA、または配列番号3に記載の塩基配列で表わされるマウス由来DNAが好ましく例示できる。D<sub>1</sub>g遺伝子は配列番号1または3に記載の塩基配列で表されるDNAに限定されず、該DNAを含むDNA、または該DNAと約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、さらに好ましくは約95%以上の相同性を有するDNAであることができる。あるいは、該塩基配列において1個以上、例えば1乃至100個、好ましくは1乃至30個、より好ましくは1乃至20個、さらに好ましくは1乃至10個、特に好ましくは1乃至数個のヌクレオチドの欠失、置換、付加または挿入といった変異が存する塩基配列またはその相補的塩基配列で表わされるDNAが含まれる。変異の程度およびそれらの位置等は、該変異を有するDNAがsFRPの発現および/または機能を増強する機能を有する蛋白質をコードするDNAである限り特に制限されない。かかる変異を有するDNAは、天然に存在するDNAであってよく、誘発変異を有するDNAであってよい。また、天然由来の遺伝子に基づいて変異を導入して得たDNAであってもよい。変異を導入する方法は自体公知であり、例えば、部位特異的変異導入法、遺伝子相同組換え法、プライマー伸長法またはPCR等を、単独または適宜組合せて用いることができる。例えば成書に記載の方法（村松正實編、「ラボマニュアル遺伝子工学」、1988年、丸善株式会社；およびエールリッヒ（Ehrlich, H. A.）編、「PCRテクノロジー、DNA增幅の原理と応用」、1989年、ストックトンプレス）に準じて、あるいはそれらの方法を改変して実施することができ、ウルマーの技術（ウルマー（Ulmer, K. M.）、「サイエンス（Science）」、1983年、第219巻、p. 666-671）を利用することができる。

### 【0024】

D<sub>1</sub>g遺伝子を含有する組換えベクターは、上記方法により取得したD<sub>1</sub>g遺伝子を適当なベクターDNAに挿入することにより得ることができる。ベクターDNAは宿主中で複製可能であり、D<sub>1</sub>gの発現を可能にするベクターDNAであれば特に限定されず、宿主の種類および使用目的により適宜選択される。ベクターDNAは、天然に存在するDNAを抽出して得られたベクターDNAの他、複製に必要な部分以外のDNAの部分が一部欠落しているベクターDNAでもよい。代表的なベクターDNAとして例えば、プラスミド、バクテリオファージおよびウイルス由来のベクターDNAを挙げることができる。プラスミドDNAとしては、大腸菌由来のプラスミド、枯草菌由来のプラスミド、酵母由来のプラスミド等を例示できる。バクテリオファージDNAとしては、入ファージ等が挙げられる。ウイルス由来のベクターDNAとしては例えはレトロウイルス、ワクシニアウイルス、アデノウイルス、バボバウイルス、SV40、鶏痘ウイルス、および仮性狂犬病ウ

イルス等の動物ウイルス由来のベクター、あるいはバキュロウイルス等の昆虫ウイルス由来のベクターが挙げられる。その他、トランスポゾン由来、挿入エレメント由来、酵母染色体エレメント由来のベクターDNA等を例示できる。あるいは、これらを組合せて作成したベクターDNA、例えばプラスミドおよびバクテリオファージの遺伝学的エレメントを組合せて作成したベクターDNA（コスマドやファージミド等）を例示できる。ベクターDNAには、D<sub>1</sub>g遺伝子の機能が発揮されるように遺伝子を組込むことが必要であり、少なくともD<sub>1</sub>g遺伝子とプロモーターとをその構成要素とする。これら要素に加えて、所望によりさらに、複製そして制御に関する情報を担持した遺伝子配列を組合せて自体公知の方法によりベクターDNAに組込むことができる。かかる遺伝子配列として、例えば、リボソーム結合配列、ターミネーター、シグナル配列、エンハンサー等のシスエレメント、スプライシングシグナル、および選択マーカー（ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子、アンピシリン耐性遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子等）等を例示できる。これらから選択した1種類または複数種類の遺伝子配列をベクターDNAに組込むことができる。ベクターDNAにD<sub>1</sub>g遺伝子を組込む方法は、自体公知の方法を適用できる。例えば、D<sub>1</sub>g遺伝子を適当な制限酵素により処理して特定部位で切断し、次いで同様に処理したベクターDNAと混合し、リガーゼにより再結合する方法が用いられる。あるいは、D<sub>1</sub>g遺伝子に適当なリンカーをライゲーションし、これを目的に適したベクターのマルチクローニングサイトへ挿入することによっても、所望の組換えベクターが得られる。D<sub>1</sub>g遺伝子を組込んだベクターDNAにより、宿主を形質転換して得られる形質転換体は、D<sub>1</sub>g遺伝子がコードする蛋白質の製造に有用である。宿主としては、原核生物および真核生物のいずれも用いることができる。原核生物としては、例えば大腸菌（*Escherichia coli*）等のエシェリヒア属、枯草菌等のバシリス属、シュードモナスプチダ（*Pseudomonas putida*）等のシュードモナス属、リゾビウムメリオティ（*Rhizobium meliloti*）等のリゾビウム属に属する細菌が挙げられる。真核生物としては、酵母、昆虫細胞および哺乳動物細胞等の動物細胞を例示できる。酵母は、サッカロミセス・セレビシエ（*Saccharomyces cerevisiae*）、シズサッカロミセスポンベ（*Schizosaccharomyces pombe*）等が挙げられる。昆虫細胞は、Sf9細胞やSf21細胞等を例示できる。哺乳動物細胞は、サル腎由来細胞（COS細胞、Vero細胞等）、チャイニーズハムスター卵巣細胞（CHO細胞）、マウスL細胞、ラットGH3細胞、ヒトFL細胞や293EBNA細胞等が例示できる。好ましくは哺乳動物細胞を用いる。ベクターDNAの宿主細胞への導入は、自体公知の手段が応用され、例えば成書に記載されている標準的な方法（村松正實編、「ラボマニュアル遺伝子工学」、1988年、丸善株式会社）により実施できる。より好ましい方法としては、遺伝子の安定性を考慮するならば染色体内へのインテグレート法が挙げられるが、簡便には核外遺伝子を利用した自律複製系を使用できる。具体的には、リン酸カルシウムトランسفエクション、DEAE-デキストラン媒介トランسفエクション、マイクロインジェクション、陽イオン脂質媒介トランسفエクション、エレクトロポレーション、形質導入、スクレープ負荷（scrape loading）、バリスティック導入（ballistic introduction）および感染等が挙げられる。原核生物を宿主とする場合、組換えベクターが該原核生物中で自律複製可能であると同時に、プロモーター、リボソーム結合配列、D<sub>1</sub>g遺伝子、転写終結配列により構成されていることが好ましい。また、プロモーターを制御する遺伝子が含まれていてもよい。細菌を宿主とする場合、プロモーターとしては大腸菌等の細菌中で発現できるプロモーターであればいずれも利用可能である。例えば、trpプロモーター、lacプロモーター、PLプロモーター、PRプロモーター等の、大腸菌やファージに由来するプロモーターが用いられる。lacプロモーター等の人為的に設計改変されたプロモーターを用いてもよい。細菌への組換えベクターの導入方法としては、細菌にDNAを導入する方法であれば特に限定されず、いずれも利用可能である。好ましくは例えば、カルシウムイオンを用いる方法、エレクトロポレーション法等を利用できる。哺乳動物細胞を宿主とする場合、組換えベクターが該細胞中で自律複製可能であると同時に、プロモ

ーター、R N Aスプライス部位、D 1 g 遺伝子、ポリアデニル化部位、転写終結配列により構成されていることが好ましい。また、所望により複製起点が含まれていてもよい。プロモーターとしてはS R  $\alpha$  プロモーター、S V 4 0 プロモーター、L T R プロモーター、C M V プロモーター等が用いられ、また、サイトメガロウイルスの初期遺伝子プロモーター等を用いてもよい。哺乳動物細胞への組換えベクターの導入方法としては、好ましくは例えば、エレクトロポレーション法、リン酸カルシウム法、リポフェクション法等を利用できる。最も好ましくは、リポフェクション法を用いる。酵母を宿主とする場合、プロモーターとしては酵母中で発現できるプロモーターであれば特に限定されず、例えば、g a 1 1 プロモーター、g a 1 1 0 プロモーター、ヒートショック蛋白質プロモーター、M F  $\alpha$  1 プロモーター、P H 0 5 プロモーター、P G K プロモーター、G A P プロモーター、A D H プロモーター、A O X 1 プロモーター等が挙げられる。酵母への組換えベクターの導入方法としては、酵母にD N Aを導入する方法であれば特に限定されず、好ましくは例えば、エレクトロポレーション法、スフェロプラスト法、酢酸リチウム法等を利用できる。昆虫細胞を宿主とする場合、組換えベクターの導入方法としては、好ましくは例えば、リン酸カルシウム法、リポフェクション法、エレクトロポレーション法等を利用できる。

### 【0025】

D 1 g によるs F R P の発現および／または機能を増強する作用を有する化合物は、例えば、D 1 g 遺伝子欠損非ヒト哺乳動物を用いた同定方法により取得することができる。D 1 g 遺伝子欠損非ヒト哺乳動物として、好ましくは、D 1 g 遺伝子ヘテロ欠損非ヒト哺乳動物、より好ましくはD 1 g 遺伝子ヘテロ欠損マウスを例示できる。このような哺乳動物に調べようとする化合物（以下、被検化合物と称する）を投与してs F R P 発現を測定し、被検化合物を投与した該哺乳動物のs F R P の発現量が被検化合物を投与しなかった該哺乳動物と比較して増加した場合、該被検化合物はs F R P の発現を増強する作用を有すると判定できる。このような同定方法において、D 1 g の発現を測定することにより、D 1 g の発現を増強する作用を有する化合物を取得することができる。このような同定方法において、s F R P またはD 1 g の発現量を測定する代わりに、s F R P またはD 1 g の機能を測定し、被検化合物を投与した該哺乳動物のs F R P またはD 1 g の機能が該被検化合物を投与しなかった該哺乳動物と比較して増加した場合、該被検化合物はs F R P またはD 1 g の機能を増強する作用を有すると判定できる。s F R P の機能としては、W n t シグナル伝達経路を阻害する作用が挙げられる。D 1 g の機能としては、例えばs F R P の発現を増強する機能が挙げられる。D 1 g の発現やs F R P の発現の測定は、これらの遺伝子の転写産物であるm R N Aの測定や、該m R N Aの翻訳産物である蛋白質の測定を実施することにより達成できる。m R N Aの測定方法としては、自体公知の遺伝子検出法がいずれも使用可能である。具体的には、ササンプロット法、ノザンプロット法、N A S B A 法、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（R T - P C R）、マークハイブリダイゼーション、またはコロニーハイブリダイゼーション等が例示できる。また、i n s i t u R T - P C Rやi n s i t u ハイブリダイゼーション等を利用した細胞レベルでの測定による検出方法も利用可能である。このような遺伝子検出法においては、遺伝子の測定の実施に、該遺伝子の部分配列からなるオリゴヌクレオチドであってプローブとしての性質を有するものまたはプライマーとしての性質を有するものが有用である。プローブとしての性質を有するオリゴヌクレオチドとは、該遺伝子のみに特異的にハイブリダイゼーションできる該遺伝子特有の配列からなるものを意味する。プライマーとしての性質を有するものとは該遺伝子のみを特異的に增幅できる該遺伝子特有の配列からなるものを意味する。プローブまたはプライマーとしては、塩基配列長が一般的に5乃至50ヌクレオチド程度であるものが好ましく、10乃至35ヌクレオチド程度であるものがより好ましく、15乃至30ヌクレオチド程度であるものがさらに好ましい。プローブは、通常は標識したプローブを用いるが、非標識であってもよい。また、直接的または間接的に標識したリガンドとの特異的結合により検出してもよい。プローブおよびリガンドを標識する方法は、種々の方法が知られており、例えばニックトランスレーション、ランダムプライミングまたはキナーゼ処理を利用する方法等を例示できる。適当な標識としては、放射性同位

体、ビオチン、蛍光物質、化学発光物質、酵素、抗体等が挙げられる。遺伝子検出法としては、PCRが感度の点から好ましい。PCRは、D1g遺伝子またはsFRP遺伝子を特異的に増幅できるプライマーを用いる方法である限り、従来公知の方法のいずれも使用可能である。例えばRT-PCRが例示できるが、その他、当該分野で用いられる種々のPCRの変法を適応することができる。PCRにより、遺伝子の検出の他に、遺伝子の定量も可能である。かかる分析方法としては、MSSA法等の競合的定量法、または一本鎖DNAの高次構造の変化に伴う移動度の変化を利用した突然変異検出法として知られるPCR-SSCP法を例示できる。一方、D1gまたはsFRPの測定は、慣用技術による蛋白質検出法あるいは定量法を用いて行うことができる。例えば、D1gまたはsFRPに対する特異抗体を用いて免疫沈降を行い、ウェスタンプロット法またはイムノプロット法により、D1gまたはsFRPの測定が可能である。また、D1gまたはsFRPに対する抗体により、免疫組織化学的技術を用いてパラフィンまたは凍結組織切片中のD1gまたはsFRPを検出可能である。D1gまたはsFRPを検出する方法の好ましい具体例としては、モノクローナル抗体および/またはポリクローナル抗体を用いるサンドイッチ法を含む、酵素免疫測定法(ELISA)、放射線免疫検定法(RIA)、免疫放射線検定法(IRMA)、および免疫酵素法(IEMA)等が挙げられる。その他、ラジオイムノアッセイや競争結合アッセイ等を利用することができる。他方、D1gの機能の測定は、D1gがsFRPの発現を増強することから、例えはsFRPの発現や機能を測定することにより達成できる。また、sFRPの機能の測定は、sFRPがWntと結合することによりWntシグナル活性化の阻害作用を示すことから、例えは、該結合または該阻害作用を測定することにより達成できる。sFRPとWntとの結合の測定は、慣用のバイオインディケーションアッセイにより実施できる。Wntシグナルの活性化の阻害作用は、Wntシグナルの活性化により増加するβ-カテニンの発現を測定し、その発現が阻害されることを検出することにより測定できる。β-カテニンの発現は、上記D1gの発現の測定方法と同様の方法により測定できる。

#### 【0026】

D1g遺伝子ヘテロ欠損非ヒト哺乳動物を用いて、また、腫瘍形成を阻害する化合物を同定することができる。このような哺乳動物に被検化合物を投与して腫瘍が形成されたか否かを測定し、被検化合物を投与した該哺乳動物における腫瘍形成が被検化合物を投与しなかった該哺乳動物と比較して低減または消失した場合、該被検化合物は腫瘍形成を阻害すると判定できる。腫瘍が形成されたか否かの測定は、簡便には形成された腫瘍または腫瘍が形成された組織のサイズや重量等を測定することにより実施できる。

#### 【0027】

被検化合物の投与経路は、全身投与または局所投与のいずれも選択可能である。例えは、非経口経路として、通常の静脈内投与または動脈内投与を挙げることができる。あるいは経口による投与も可能である。被検化合物としては、例えは化学ライブラリーや天然物由来の化合物等が挙げられる。

#### 【0028】

上記化合物の同定方法は、D1g遺伝子ヘテロ欠損非ヒト哺乳動物を用いるかわりに、該哺乳動物由来の細胞を用いて実施可能である。該細胞は、D1g対立遺伝子の一方が欠失していること、またはD1gの発現および/または機能が低下していることが確認された細胞であることが好ましい。D1g対立遺伝子の遺伝子型の解析は、例えは、後述するようにPCRまたはサザンプロット法により実施できる。好ましい細胞として、胚性線維芽細胞を例示できる。さらに、上記哺乳動物由来の細胞は、自体公知の方法により永久増殖化して、本同定方法に使用することも可能である。細胞を用いる同定方法においては、細胞と被検化合物を接触させ、その後、該細胞内におけるD1gの発現を測定し、被検化合物を接触させた該細胞のD1g発現量が被検化合物を接触させなかった該細胞と比較して増加した場合、該被検化合物はD1gの発現を増強する作用を有すると判定できる。また、このとき、D1gの発現を測定する代わりに、D1gの機能を測定し、被検化合物を接触させた該細胞のD1gの機能が被検化合物を接触させなかった該細胞と比較して増加

した場合、該被検化合物はD1gの機能を増強する作用を有すると判定できる。このような同定方法において、sFRPの発現および／または機能を測定することにより、sFRPの発現および／またはを増強する作用を有する化合物を得ることができる。sFRPの発現を増強する作用を有する化合物の同定方法は、D1g遺伝子ヘテロ欠損非ヒト哺乳動物由来の細胞の代わりに、D1g遺伝子ホモ欠損非ヒト哺乳動物由来の細胞を用いて実施することも可能である。

#### 【0029】

D1g遺伝子欠損非ヒト哺乳動物由来の細胞を用いて、さらに、sFRP遺伝子のメチル化を阻害する作用および／またはsFRP遺伝子を脱メチル化する作用を有する化合物の同定方法を実施可能である。「sFRP遺伝子のメチル化を阻害する作用」とは、DNAメチルトランスフェラーゼによるsFRP遺伝子中のシトシン塩基へのメチル基付加を阻害する作用をいう。「sFRP遺伝子を脱メチル化する作用」とは、sFRP遺伝子中のシトシン塩基に付加されたメチル基を取り去る作用をいう。このような同定方法には、D1g遺伝子ホモ欠損非ヒト哺乳動物およびD1g遺伝子ヘテロ欠損非ヒト哺乳動物のいずれに由来する細胞も使用可能である。D1g遺伝子ホモ欠損マウスにおいては、該遺伝子ヘテロ欠損マウスと比較して、sFRPの発現および／または機能の低下が著しいことから、このような同定方法には、D1g遺伝子ホモ欠損非ヒト動物由来の細胞の使用が好ましく推奨される。より好ましくは、D1g遺伝子ホモ欠損マウス由来の細胞を使用した同定方法が推奨される。細胞と被検化合物を接触させ、その後、該細胞内におけるsFRP遺伝子のメチル化を測定し、被検化合物を接触させた該細胞におけるsFRP遺伝子のメチル化量と比較して減少した場合、該被検化合物はsFRP遺伝子のメチル化を阻害する作用および／またはsFRP遺伝子を脱メチル化する作用を有すると判定できる。sFRP遺伝子のメチル化の測定は、自体公知の方法により実施できる。例えば、亜硫酸水素塩シークエンス法（スズキ（Suzuki, H.）ら、「ネイチャー ジェネティクス（Nature Genetics）」、2002年、第31巻、p. 141-149）、マイクロアレイを用いたDMH（differential methylation hybridization）法（ヤン（Yan, P. S.）ら、「クリニカル キャンサー リサーチ（Clinical Cancer Research）」、2000年、第6巻、p. 1432-1438）、蛍光色素を用いたリアルタイムPCR法であるメチルライト法（トリン（Trinh, B. N.）ら、「メソッズ（Methods）」、2001年、第25巻、p. 456-462）等の方法が例示できる。

#### 【0030】

D1g遺伝子欠損非ヒト哺乳動物は、D1g遺伝子を人為的に欠損させ、D1gの発現を消失または低下させた、ヒトを含まない哺乳動物をいう。非ヒト哺乳動物とて、マウス、ラット、ハムスター、モルモット、ウシ、ブタ、ヤギ等が挙げられるが、その中で、個体発生および生物サイクルが比較的短く、また繁殖が容易なげっ歯類、より好ましくはマウスを例示できる。D1g遺伝子欠損非ヒト哺乳動物は、例えばジーンターゲティング法等の遺伝子工学的手法を利用して、染色体のD1g遺伝子を任意に変換させることにより作製できる〔「ジーンターゲティング：ア プラクティカル アプローチ（プラクティカル アプローチ シリーズ 212）（Gene targeting：a practical approach (Practical Approach Series 212)」、第2版、2000年、ジョイヤー、アレクサンドラ（Joyner, Alexandra L.）編、出版：オックスフォードユニバーシティープリント（Oxford University Print）等〕。ジーンターゲティング法では、まず、ゲノムライブラリーより単離したクローニングをもとに、発現能を有さないD1g遺伝子を含むコンストラクト（ターゲティングベクター）を作製し、胚性幹細胞（Embryonic Stem Cell；以下、ES細胞と略称することもある）に遺伝子導入し、相同組換えが生じたD1g遺伝子変異クローニングを得る。「発現能を有さないD1g遺伝子」とは、D1gの発現を阻害するような変異、または該遺伝子がコードする蛋白質の機能を喪

失させるような変異を加えたD 1 g 遺伝子を意味する。D 1 g 遺伝子への変異の導入は、公知の遺伝子工学的手法により、D 1 g 遺伝子の塩基配列の一部または全部の除去や別の遺伝子の挿入または置換を行なうことにより実施できる。このような変異の導入の結果、プロモーターまたはエキソンの機能の破壊、あるいはコドンの読み取り枠がずれることにより、D 1 g の発現が低下あるいは消失したノックアウトマウスが作製できる。プロモーターまたはエキソンの機能の破壊するために導入する遺伝子としては、薬剤耐性遺伝子等、例えはネオマイシン耐性遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子、好ましくはネオマイシン耐性遺伝子が例示できる。ここに例示した遺伝子以外に、ジーンターゲティング法で一般的に用いられている遺伝子は、いずれも使用可能である。E S 細胞は、非ヒト哺乳動物の胚盤胞から樹立できる。例えは、マウスのE S 細胞として、C 5 7 B L / 6 マウスとC B A / J N C r j マウスの間の雑種第一代胚盤胞から樹立したT T 2 E S 細胞を例示できる。ターゲティングベクターを遺伝子導入したE S 細胞からの、相同組換えが生じたD 1 g 遺伝子変異クローンの選別は、ターゲティングベクターを遺伝子導入したクローンについて、その遺伝子型を解析することにより実施できる。遺伝子型の解析は、P C R またはサザンブロッティング法により行なうことができる。P C Rにおいては、プライマーとしてターゲティングベクター中のD 1 g 遺伝子の部分塩基配列からなるオリゴヌクレオチドおよびプロモーターまたはエキソンの機能を破壊するために導入した遺伝子の部分配列からなるオリゴヌクレオチドを使用することにより、D 1 g 遺伝子の欠失を検出することができる。サザンブロッティング法においては、D 1 g 遺伝子またはその近傍のD N A 配列をプローブとして用いて検出されたD N A のサイズにより、D 1 g 遺伝子の欠失を検出することができる。あるいは、ターゲティングベクターの作製に上記薬剤耐性遺伝子を用いた場合には、変異クローンの薬剤耐性を利用して、該変異クローンを容易に選別することができる。このようにして得られたD 1 g 遺伝子変異クローンを非ヒト哺乳動物の受精卵の胚盤胞（b l a s t o c y s t ）または8細胞期胚に注入し、偽妊娠状態にした同種の非ヒト哺乳動物の子宮に移植することで、正常なD 1 g 遺伝子座をもつ細胞と変異したD 1 g 遺伝子座をもつ細胞とから構成されるキメラ個体が得られる。キメラ個体を野生型個体と交配させることで相同染色体の一方に変異が導入された個体（ヘテロ欠損個体）または相同染色体の両方に変異が導入された個体（ホモ欠損個体）を得ることができる。一般的には、該交配により、ヘテロ欠損個体が得られる。ホモ欠損個体は、ヘテロ遺伝子欠損個体同志の交配により得ることができる。

### 【0031】

上記同定方法により得られたD 1 g の発現および／または機能を増強する作用を有する化合物は、D 1 g の発現増強剤および／または機能増強剤、s F R P の発現増強剤および／または機能増強剤、抗腫瘍剤、あるいは腫瘍疾患の防止剤および／または治療剤の有効成分として使用できる。上記化合物の同定方法により得られたs F R P の発現および／または機能を増強する作用を有する化合物は、抗腫瘍剤、あるいは腫瘍疾患の防止剤および／または治療剤として使用できる。上記化合物の同定方法により得られた腫瘍形成を阻害する化合物は、腫瘍疾患の防止剤および／または治療剤として使用できる。また、上記同定方法により得られたs F R P のメチル化を阻害する作用および／または脱メチル化する作用を有する化合物は、s F R P のメチル化阻害剤および／または脱メチル化剤、s F R P の発現増強剤および／または機能増強剤、抗腫瘍剤、あるいは腫瘍疾患の防止剤および／または治療剤の有効成分として使用できる。これら薬剤は、D 1 g が関与する腫瘍形成抑制機序の解明、並びに腫瘍疾患の防止、または治療に有用である。また、上記化合物を少なくとも1つを用いて、D 1 g の発現増強方法および／または機能増強方法、s F R P のメチル化阻害方法および／または脱メチル化方法、s F R P の発現増強方法および／または機能増強方法、腫瘍形成阻害方法、あるいは腫瘍疾患の防止方法および／または治療方法の実施が可能である。例えは、s F R P の発現増強方法および／または機能増強方法は、上記化合物の少なくとも1つを対象に投与する、あるいは、対象由来の細胞または培養細胞株等にインビトロで（i n V i t r o ）接触させることにより実施できる。腫瘍形成阻害方法あるいは腫瘍疾患の防止方法および／または治療方法は、例えは、上記化合

物の少なくとも1つを対象に投与することにより実施できる。

### 【0032】

D 1 g の発現増強剤および／または機能増強剤、s F R P のメチル化阻害剤および／または脱メチル化剤、s F R P の発現増強剤および／または機能増強剤、抗腫瘍剤、あるいは腫瘍疾患の防止剤および／または治療剤は、通常は、1種または2種以上の医薬上許容される担体（医薬用担体）を用いて医薬組成物として製造することが好ましい。これら薬剤は、単独で使用することもできるし、複数を組合せて使用することも可能である。医薬製剤中に含まれる有効成分の量は、広範囲から適宜選択される。通常、約0.00001乃至70重量%、好ましくは0.0001乃至5重量%程度の範囲とするのが適当である。医薬用担体としては、製剤の使用形態に応じて通常使用される、充填剤、增量剤、結合剤、付湿剤、崩壊剤、表面活性剤、滑沢剤等の希釈剤や賦形剤等を例示でき、これらは得られる製剤の投与形態に応じて適宜選択使用される。例えば水、医薬的に許容される有機溶剤、コラーゲン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、カルボキシビニルポリマー、アルギン酸ナトリウム、水溶性デキストラン、カルボキシメチルスターーチナトリウム、ペクチン、キサンタンガム、アラビアゴム、カゼイン、ゼラチン、寒天、グリセリン、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、ワセリン、パラフィン、ステアリルアルコール、ステアリン酸、ヒト血清アルブミン、マンニトール、ソルビトール、ラクトース等が挙げられる。これらは、所望の剤形に応じて適宜1種類または2種類以上を組合せて使用される。所望により、通常の蛋白質製剤に使用され得る各種の成分、例えば安定化剤、殺菌剤、緩衝剤、等張化剤、キレート剤、p H調整剤等を適宜使用して調製することもできる。安定化剤としては、例えばヒト血清アルブミンや通常のL-アミノ酸、糖類、セルロース誘導体等を例示できる。これらは単独でまたは表面活性剤等と組合せて使用できる。特にこの組合せによれば、有効成分の安定性をより向上させ得る場合がある。上記L-アミノ酸は、特に限定はなく、例えばグリシン、システイン、グルタミン酸等のいずれでもよい。糖類も特に限定はなく、例えばグルコース、マンノース、ガラクトース、果糖等の单糖類、マンニトール、イノシトール、キシリトール等の糖アルコール、ショ糖、マルトース、乳糖等の二糖類、デキストラン、ヒドロキシプロピルスターーチ、コンドロイチン硫酸、ヒアルロン酸等の多糖類等およびそれらの誘導体等のいずれでもよい。セルロース誘導体も特に限定はなく、メチルセルロース、エチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム等のいずれでもよい。表面活性剤も特に限定はなく、イオン性および非イオン性表面活性剤のいずれも使用できる。これには、例えばポリオキシエチレングリコールソルビタンアルキルエステル系、ポリオキシエチレンアルキルエーテル系、ソルビタンモノアシルエステル系、脂肪酸グリセリド系等が包含される。緩衝剤としては、ホウ酸、リン酸、酢酸、クエン酸、ε-アミノカプロン酸、グルタミン酸および／またはそれらに対応する塩（例えばそれらのナトリウム塩、カリウム塩、カルシウム塩、マグネシウム塩等のアルカリ金属塩やアルカリ土類金属塩）等を例示できる。等張化剤としては、例えば塩化ナトリウム、塩化カリウム、糖類、グリセリン等を例示できる。キレート剤としては、例えばエデト酸ナトリウム、クエン酸等を例示できる。

### 【0033】

上記薬剤および医薬組成物は、溶液製剤として使用できる。その他、これを凍結乾燥化し保存し得る状態にした後、用時、水や生理的食塩水等を含む緩衝液等で溶解して適当な濃度に調製した後に使用することも可能である。

### 【0034】

上記薬剤または医薬組成物の用量範囲は特に限定されず、含有される成分の有効性、投与形態、投与経路、疾患の種類、対象の性質（体重、年齢、病状および他の医薬の使用の有無等）、および担当医師の判断等に応じて適宜選択される。一般的には適当な用量は、例えば対象の体重1kgあたり約0.01μg乃至100mg程度、好ましくは約0.1μg乃至1mg程度の範囲であることが好ましい。しかしながら、当該分野においてよく知られた最適化のための一般的な常套的実験によりこれら用量の変更を行うことができる。

。上記投与量は1日1乃至数回に分けて投与することができ、数日または数週間に1回の割合で間欠的に投与してもよい。

#### 【0035】

上記薬剤または医薬組成物が適用できる疾患としては、D1gによるSFRPの発現およびまたは機能の、低下または消失に起因する疾患、例えは腫瘍疾患が挙げられる。腫瘍疾患に適用する場合、対象となる腫瘍の種類は特に限定されず、固形腫瘍または非固形腫瘍のいずれにも適用可能である。D1gは種々の組織や細胞において普遍的に発現していることから、D1gの発現異常や変異等によるD1g機能の低下は、多くの組織や細胞において腫瘍形成を誘発すると考えられる。したがって、固形腫瘍または非固形腫瘍の種類も特に限定されず、いずれの腫瘍において適用できる。例えは、胃癌、食道癌、大腸癌、小腸癌、十二指腸癌、肺癌、肝臓癌、胆嚢癌、肺臓癌、膀胱癌、口腔癌、骨癌、皮膚癌、乳癌、子宮癌、前立腺癌、脳腫瘍、神経芽腫等の固形腫瘍、あるいは白血病や悪性リンパ腫等の非固形腫瘍等を挙げることができる。好ましくは、D1gの発現低下および／または機能の低下、あるいはD1g遺伝子やD1gの変異が認められる腫瘍に適用することが推奨される。より好ましくは、D1g+/-マウスにおいて皮膚癌およびリンパ腫が形成されたことから、皮膚癌およびリンパ腫に適用することが推奨される。上記薬剤または医薬組成物を投与するときには、該薬剤または該医薬組成物を単独で使用してもよく、あるいは該薬剤または該医薬組成物の適用対象である疾患の防止または治療に必要な他の化合物または医薬と併用してもよい。例えは、上記薬剤または医薬組成物を腫瘍疾患の防止方法または治療方法に用いるときに、該薬剤または該医薬組成物とは別種の、腫瘍疾患の防止剤または治療剤を併用することが可能である。

#### 【0036】

投与経路は、全身投与または局所投与のいずれも選択することができる。この場合、疾患、症状等に応じた適当な投与経路を選択する。例えは、非経口経路として、通常の静脈内投与、動脈内投与の他、皮下、皮内、筋肉内等への投与を挙げることができる。あるいは経口による投与も可能である。さらに、経粘膜投与または経皮投与も可能である。また、腫瘍疾患に適用する場合は腫瘍に注射等により直接投与することもできる。

#### 【0037】

投与形態としては、各種の形態が治療目的に応じて選択でき、その代表例として、錠剤、丸剤、散剤、粉末剤、細粒剤、顆粒剤、カプセル剤等の固体投与形態や、水溶液製剤、エタノール溶液製剤、懸濁剤、脂肪乳剤、リポソーム製剤、シクロデキストリン等の包接体、シロップ、エリキシル等の液剤投与形態が含まれる。これらは更に投与経路に応じて経口剤、非経口剤（点滴剤、注射剤）、経鼻剤、吸入剤、経膣剤、坐剤、舌下剤、点眼剤、点耳剤、軟膏剤、クリーム剤、経皮吸収剤、経粘膜吸収剤等に分類され、それぞれ通常の方法に従い、調合、成形、調製することができる。

#### 【0038】

D1gの発現および／または機能を増強するために、D1g遺伝子または該遺伝子を含有する遺伝子導入用ベクターを有効成分として含む遺伝子治療剤を用いることも可能である。該遺伝子治療剤は、該ベクターにより該遺伝子が導入された細胞を有効成分として含む遺伝子治療剤であることもできる。遺伝子治療剤は、一般的には、注射剤、点滴剤、あるいはリポソーム製剤として調製することが好ましい。遺伝子治療剤が、遺伝子が導入された細胞を含む形態に調製される場合は、該細胞をリン酸緩衝化生理食塈水（pH 7.4）、リゲル液、細胞内組成液用注射剤中に配合した形態等に調製することもできる。遺伝子治療剤は、また、プロタミン等の遺伝子導入効率を高める物質と共に投与されるような形態に調整することもできる。遺伝子治療剤は、1日に1回または数回に分けて投与することができ、1日から数週間の間隔で間歇的に投与することもできる。医薬製剤としての所望遺伝子含有ウイルスベクターの投与量は、一般的には例えはレトロウイルスベクターであれば1日あたり体重1kgあたりレトロウイルスの力価として約 $1 \times 10^3$  pfuから $1 \times 10^{15}$  pfu程度とするのがよい。また、製剤中の有効成分が所望の遺伝子を導入された細胞である場合は、細胞数 $1 \times 10^4$ /ヒトから $1 \times 10^{15}$ /ヒト程度の範

囲から選ばれるのが適当である。遺伝子治療剤を用いる治療法は、上記遺伝子を直接体内に導入するインビボ法と、患者の体内より標的とする細胞を一旦取り出して体外で遺伝子を導入して、その後、該細胞を体内に戻すエクスビボ法の両方の方法を包含する。インビボ法がより好ましい。遺伝子の体内または細胞内への導入法としては、非ウイルス性のトランسفエクション法、あるいはウイルスベクターを利用したトランسفエクション方法のいずれも適用することができる。非ウイルス性のトランسفエクション法は、ウイルスベクターを利用した方法と比較して、安全性および簡便性の点で優れおりかつ安価であるためより好ましい。非ウイルス性のトランسفエクション法としては、例えば、リン酸カルシウム共沈法；プラスミドDNAを直接インビボで標的組織に注入するネイキッドDNA法；多重膜正電荷リポソームに封入した遺伝子を細胞に導入するカチオニックリポソーム法；プラスミドDNAを金でコートして高圧放電によって物理的に細胞内にDNAを導入する所謂遺伝子銃と呼ばれる方法；DNAを封入したリポソームと不活化センダイウイルスを融合させて作成した膜融合リポソームを用いる膜融合リポソーム法；標的組織または標的細胞に発現する受容体に結合するリガンドとDNAとの結合体を用いるリガンド-DNA複合体法；DNAを封入したリポソームの表面に標的組織または標的細胞表面に結合する抗体を結合させたイムノリポソームを用いるイムノリポソーム法等が挙げられる。その他、ポリマーやペプチド等を用いるトランسفエクション法が知られている。非ウイルス性のトランسفエクション法は上記例示に限定されず、ウイルスベクターを用いて標的組織または標的細胞に遺伝子をトランسفエクションできる限りいずれの方法も使用可能である。ウイルスベクターを使用するトランسفエクション法において、トランسفエクションに使用するベクターとしては、好ましくはレトロウイルスベクターを例示できる。レトロウイルスベクター以外のRNAウイルスベクターやDNAウイルスベクター、例えばアデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、ヘルペスウイルスベクター等を使用することも可能である。これらウイルスベクターを用いることにより効率良い投与が可能である。さらに、ウイルスベクターを用いるトランسفエクション法においても、該ベクターをリポソームに封入して、そのリポソームを投与する方法が推奨される。リポソームを用いることにより目的物質の標的細胞または標的組織への送達を効率的に行えるため、ウイルスベクターとリポソームとの複合治療は、高い効果を奏すと考える。また、リポソームを用いた治療において、リポソームが比較的安定で、主要な免疫応答を生じることがないことが知られていることからも、かかる複合治療の有用性が示唆される。リポソームとしては、カチオン性脂質から製造されるリポソームが好ましい。かかるトランسفエクション用ベクターの細胞への導入は、例えばエレクトロポレーション、リン酸カルシウム共沈法、ウイルス形質導入等を始めとする、細胞にDNAを導入する当該分野において既に知られている各種の方法に従うことができる。形質転換された細胞は、それ自体単離状態で医薬や、治療研究のためのモデル系として利用することも可能である。なおトランسفエクション用ベクターの製造において、導入される遺伝子は、D1g遺伝子の塩基配列情報に基づいて、前記の如く、一般的遺伝子工学的手法により容易に製造・取得することができる。遺伝子を導入する標的組織および標的細胞は、遺伝子治療の対象により適宜選択することができる。例えば、標的細胞として、リンパ球、線維芽細胞、肝細胞、造血幹細胞等の細胞を挙げることができるが、これらに制限されることはない。D1g遺伝子の所望の機能により、目的とする疾患の改善および／または治療が得られる限り、いずれの組織および細胞であっても導入することが可能である。

### 【0039】

D1gの発現および／または機能の低下が腫瘍形成の重要な要因であることが判明したことから、D1g遺伝子および／またはD1gの発現および／または機能を検出することにより、腫瘍疾患の診断が可能である。疾患の診断は、例えば調べようとする試料（被検試料）について、D1g遺伝子および／またはD1gの発現および／または機能を測定し、正常な対照試料との比較において、該発現および／または該機能の変化を検出することを特徴とする検査方法を用いて実施できる。正常な対照試料と比較して、D1gの発現量

および／または機能が低下または消失していたとき、該試料は腫瘍組織または腫瘍細胞由来であると判定できる。被検試料は、D1g遺伝子またはその変異遺伝子の核酸を含む限りにおいて特に制限されず、生態生物由来のあらゆる組織や細胞、例えは、細胞、血液、尿、唾液、髄液、組織生検または剖検材料等の生体生物由来の試料を例示できる。あるいは所望により試料から核酸を抽出して核酸試料を調製して用いることもできる。核酸は、ゲノムDNAを検出に直接使用してもよく、あるいは分析前にPCRまたはその他の増幅法を用いることにより酵素的に増幅してもよい。RNAまたはcDNAを同様に用いてもよい。核酸試料は、また、標的配列の検出を容易にする種々の方法、例えは変性、制限消化、電気泳動またはドットプロッティング等により調製してもよい。D1gの発現および／または機能の測定は、上記方法を使用して実施可能である。

#### 【0040】

以下、本発明を実施例に基づき具体的に説明するが、本発明は下記の実施例に限定されない。

#### 【実施例1】

##### 【0041】

###### D1gノックアウトマウスの作製

###### <材料および方法>

###### 1. ターゲティングベクターの構築

マウスD1g(mD1g)のゲノムDNAを、TT2ゲノムライブラリーからmD1g cDNAのアミノ末端領域(アミノ酸1-112)を用いてスクリーニングすることにより単離した。単離したクローンをpBluescript II(Stratagene社製)のEcoRI部位にサブクローニングした。ターゲティングは、mD1g遺伝子のBamHI-XhoI領域をネオマイシン耐性遺伝子と置換するように設計した。相同性のための短腕はエキソン2の中途の0.8kb BamHI-ClaIゲノム断片を、長腕は9.5kb ClaI-XhoI断片を用いた。プロモーターおよびポリアデニレーションシグナルを連結していないネオマイシン耐性遺伝子は、mD1g断片のClaI部位に、平滑末端ライゲーション(blant-end ligation)およびインフレーム融合(in-frame fusion)により挿入した。得られたベクターは、pBluescript IIにサブクローニングし、NotIで線状化した。

##### 【0042】

###### 2. ES細胞培養およびトランスフェクション

TT2 ES細胞は、C57BL/6マウスとCBA/JNCrljマウス間の雑種第1代(F1)胚盤胞から樹立し、フィーダー細胞上で培養した。フィーダー細胞として、胎生14日目マウス胚から調製してマイトイマイシンC(Sigma社製)処理した初生線維芽細胞を用いた。培養培地は、下記組成の培養培地を使用した：ダルベッコ変法イーグル培地(DMEM、NISSUI社製)；15% serum replacement(Gibco BRL社製)；1000U/ml leukemia inhibitor factor(Gibco BRL社製)；0.1mM 2-メルカプトエタノール(Sigma社製)；および1×非必須アミノ酸(Gibco BRL社製)。TT2 ES細胞(0.4mlのリン酸緩衝化生理食塩水(PBS)中、細胞数 $2 \times 10^7$ )に、50μgのNotIで線状化したターゲティングベクターをBio-Rad GenePulsar(800V、3.0mFDに設定)を用いてエレクトロポレーションによりトランスフェクションした。得られた細胞を数枚のディッシュに播種し、150μg/ml G418を用いてポジティブセレクションを次の日から開始した。エレクトロポレーションの10日後に、コロニーを採取してトリプシン処理した。細胞懸濁液の80%は新しいフィーダー細胞上で培養し、残りの細胞懸濁液はPCR分析に用いてmD1g組換えクローンの検出を行なった。PCRはEX-taq polymerase(Takara社製)を用いて30サイクル行なった。各サイクルにおいて、94°Cで1分間の変性、60°Cで1分間のアニーリング、および72°Cで3分間の重合を行なった。センスプライマーの配列およびアンチセンスプライマーを以下に示す。

### 【0043】

センスプライマー

5' - A T G C C G G T C C G G A A G C A A G A - 3' (配列番号5)

アンチセンスプライマー

5' - T C T T C A T C C T G A T A C C T G T A - 3' (配列番号6)

### 【0044】

#### 3. キメラの作製

キメラの作製は、成書（「バイオマニュアルシリーズ8 ジーンターゲティング ES細胞を用いた変異マウスの作製」、著：相沢真一、羊土社、p. 119-134等）に記載の方法に従って実施した。具体的には、上記処理を施したES細胞の約10個を、1個の8細胞期ICRマウス胚にインジェクションし、その胚を偽妊娠雌マウスの子宮に移植した。得られたマウスの遺伝子型を下記方法で確認後、交配により、D1g+/+マウス、D1g+/-マウスおよびD1g-/マウスを作製した。

### 【0045】

#### 4. 野生型対立遺伝子と変異対立遺伝子の遺伝子型決定

新生児マウスおよび成熟マウスの遺伝子型をPCR分析により定期的に調査した。野生型対立遺伝子は、mD1g遺伝子のセンスオリゴヌクレオチド（5' - G C T G T C A G T C C A C A G C T A A C A C A G G C T A C T - 3'；配列番号7）およびアンチセンスオリゴヌクレオチド（5' - T G T C C T A A G T T A A G G A C C A T C T A G A G A G C C - 3'；配列番号8）をプライマーとして用いたPCR分析において503bpの増幅産物として検出された。変異対立遺伝子は、ネオマイシン耐性遺伝子のセンス鎖オリゴヌクレオチド（5' - T C G T G C T T A C G G T A T C G C C G C T C C C G A T T - 3'；配列番号9）と上記mD1g遺伝子のアンチセンスオリゴヌクレオチド（配列番号8）を用いたPCR分析において273bpの増幅産物として検出された。

### 【0046】

サザンブロット分析を行なうために、新生児マウスの尾由来のDNA 10 μgをEco RIで消化し、0.8%アガロースゲル上で電気泳動し、ニトロセルロースフィルター（Hybond-N+；Pharmacia社製）上にプロッティングし、ジゴキシゲニン標識した5'プローブとハイブリダイゼーションさせた。

### 【0047】

#### 5. D1g蛋白質発現の解析

新生児マウスの脳溶解物（Brain lysate）をSDS-PAGEで展開し、抗D1g抗体を用いてイムノプロッティングを行なった。まず、新生児マウスの脳を摘出し、適量の溶解バッファー（Tris（pH7.4）100mM、NaCl 150mM、1%トリトン、NaF 50mM、Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> 50μM、Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1mM、アプロチニン 10μg/ml、ロイペプチド 10μg/ml）を加えすりつぶした。15000rpm、4℃で20分間遠心処理し、上清を脳溶解物とした。脳溶解物をSDS-PAGE（6%ポリアクリルアミドゲル）で展開した。トランスファーバッファー（グリシン 2.92g、Tris 5.81g、SDS 0.375g、メタノール 200ml/1000ml）を浸み込ませた濾紙4枚ずつで、ゲルおよびメンブレン（Immobilion-P；Millipore社製）を挟み、濾紙1cm<sup>2</sup>あたり1.4mAの電流で1時間かけて転写した。メンブレンを5%スキムミルクを含むトリス緩衝化生理食塩水（TBS）で30分間ブロッキングした。抗D1g抗体（Transduction社製）を5%スキムミルクを含むTBSで希釈し、メンブレンに滴下し1時間インキュベーションした。0.1%Tweenを含むTBSで5分間洗浄した。アルカリホスファターゼ結合抗マウスIgG抗体（Promega社製）をTBSで希釈してメンブレンに滴下し、30分間インキュベーションした。0.1%Tweenを含むTBSで5分間洗浄した。発色液（NBT/BCIP（Promega社製）を含むAPバッファー（Tris 100mM、NaCl 100ml、MgCl<sub>2</sub> 5mM））に浸し、D1gの発現を検出した。

【0048】

<結果>

得られたターゲティング構築物、D1g遺伝子座、および遺伝子導入された対立遺伝子を図1-Aに示した。

【0049】

第3代目の各マウスの尾由来DNAを、5'プローブを用いてサザンプロット分析した結果(図1-B)、D1g+/+マウスでは内性EcoRI断片のみが検出された。D1g-/-マウスにおいては、変異EcoRI断片のみが検出された。D1g+/+マウスにおいては、内性EcoRI断片および変異EcoRI断片の両方が検出された。

【0050】

第3代目の各マウスの遺伝子型を、各マウスの尾由来DNAを用いて遺伝子型を解析した結果(図1-C)、対立遺伝子の型は、D1g+/+マウスは野生型(wild-type)であり、D1g-/-マウスは変異型(mutant)であることが確認できた。また、D1g+/+マウスは、野生型(wild-type)および変異型(mutant)の両方の対立遺伝子を有することが確認できた。

【0051】

第3代目の各マウス由来の各D1gの発現を解析した結果(図1-D)、D1g+/+マウスおよびD1g+/+マウスではD1gが検出された。D1g-/-マウスで検出されたD1gの量は、D1g+/+マウスと比較して少なかった。しかし、D1g-/-マウスではD1gは検出されなかった。

【0052】

これら結果から、D1g+/+マウスおよびD1g-/-マウスを取得できたことが明らかになった。D1g+/+マウスについては、胚、新生児マウスおよび成熟マウスを得ることができた。しかし、D1g-/-マウスは生後短期間で死亡するため、成熟マウスを得ることはできなかつたが、胚および新生児マウスを得ることができた。D1g+/+マウスではD1gの発現が低下しており、D1g-/-マウスではD1gの発現は消失していた。

【実施例2】

【0053】

D1g-/-マウスにおいては、成長に伴って皮膚およびリンパ節に腫瘍形成が認められた。そこで、これら腫瘍について、以下の解析を行なった。

【0054】

<方法>

1. 免疫組織化学分析

D1g-/-マウスから採取した皮膚腫瘍組織を用い、常法に従って組織切片を作製した。各組織切片についてDAB染色を行なった。まず、各組織切片をホルマリン固定し、そしてパラフィン包埋した。スーパーミックス(0.25%ゼラチンおよび0.5%

Triton X-100)中で1晩ブロッキングした後、各組織切片を抗サイトケラチンAE1/AE3抗体および抗D1g抗体で1晩インキュベーションし、PBS中で3回洗浄し(1回の洗浄につき10分間)た。その後、スーパーミックスで1/250希釈したビオチン化抗マウスウサギIgGおよび抗ウサギヤギIgG(Vector社製)と1時間インキュベーションした。次いで、各組織切片をPBS中で4回洗浄し(1回の洗浄につき10分間)、スーパーミックスで1/400希釈したABCリアクションミックスチャー(Elite ABC kit; Vector社製、PK-6100)と1時間インキュベーションした。続いて、各組織切片をPBS中で3回洗浄し(1回の洗浄につき10分間)、DAB溶液(PBS中、0.2mg/ml DAB、3mg/mlニッケルアンモニウム、0.0045% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)で5分間インキュベーションした。インキュベーションは全て室温で行なった。

【0055】

2. ヘマトキシリノ・エオシン染色

D<sub>1</sub>g+/−マウスから採取したリンパ節組織を用い、常法に従って組織切片を作製し、ヘマトキシリン・エオシン染色を行なった。

### 3. フローサイトメトリーによる解析

腫瘍の形成が認められたD<sub>1</sub>g+/−マウスの頸部リンパ節を摘出し、軽くミンチして組織をほぐした後、100μmメッシュフィルターを通してほぐれなかつた組織片および細胞塊を除去し、リンパ節細胞を調製した。比較対照として、D<sub>1</sub>g+/+マウスの頸部リンパ節から同様に調製したリンパ節細胞を用いた。得られた細胞は、フルオレセインイソチオシアネート(FITC)を結合させた抗CD56抗体で染色した後、FACScanフローサイトメーターを使用して、フローサイトメトリーにより分析した。

#### 【0056】

##### <結果>

D<sub>1</sub>g+/−マウスの皮膚腫瘍組織切片は、部分的にサイトケラチンAE1/AE3染色に陽性であった。形成された腫瘍は、皮膚上皮細胞由来の汗腺腫poroid hidradenomaであると考えられた。皮膚腫瘍組織切片において、poroid hidradenoma細胞は抗D<sub>1</sub>g抗体で染色されなかつたが、筋肉は抗D<sub>1</sub>g抗体により染色された。

#### 【0057】

D<sub>1</sub>g+/−マウスのリンパ節組織切片をヘマトキシリン・エオシン染色したところ、腫瘍の形成が認められた。また、腫瘍形成が認められたD<sub>1</sub>g+/−マウスの頸部リンパ節から調製した細胞中(図2-B)には、D<sub>1</sub>g+/+マウスのリンパ節から調製した細胞(図2-A)と比較して、FITC結合抗CD56抗体で染色される細胞の著しい増加が認められた。図2-Aおよび図2-Bでは、FITC結合抗CD56抗体で染色される細胞は、R2で示される領域(図中右側の四角で囲まれた領域)に存在するドットで示される。R2に存在するドットが、図2-Aと比較して図2-Bで著しく多いことから、FITC結合抗CD56抗体で染色される細胞がD<sub>1</sub>g+/−マウスのリンパ節において著しく増加していることが判明した。FITC結合抗CD56抗体で染色された細胞は、D<sub>1</sub>g+/+マウスのリンパ節細胞では約0.10%であったのに対し、腫瘍形成が認められたD<sub>1</sub>g+/−マウスのリンパ節細胞では約66.03%であった。形成されたリンパ腫は、細胞表面上にCD56抗原を有することから、ナチュラルキラーリンパ腫であると考えられた。

#### 【0058】

これら結果から、D<sub>1</sub>g+/−マウスでは皮膚腫瘍およびリンパ腫が形成されることが明らかになった。腫瘍が形成された皮膚組織中の正常細胞ではD<sub>1</sub>gが発現していたのに対し、腫瘍細胞ではD<sub>1</sub>gが発現していなかつたことから、D<sub>1</sub>gの発現および/または機能の低下が腫瘍形成の重要な要因であると考える。

#### 【0059】

このように、D<sub>1</sub>g遺伝子の欠損により、D<sub>1</sub>gの発現および/または機能の低下し、その結果、皮膚腫瘍およびリンパ腫等の腫瘍が形成されることが判明した。

### 【実施例3】

#### 【0060】

D<sub>1</sub>gの欠損により腫瘍が形成されるメカニズムを検討する目的で、D<sub>1</sub>g欠損により発現が変化する遺伝子の検索を行なつた。当該遺伝子の検索は、実施例1で作製したD<sub>1</sub>g+/+マウスおよびD<sub>1</sub>g−/−マウス由來のマウス胚線維芽細胞(MEF)を用いて、慣用のマイクロアレイ法により行った。その結果、D<sub>1</sub>g−/−マウス由來MEFにおいてsFRP1 mRNAおよびsFRP2 mRNAの減少が認められたので、sFRP1遺伝子およびsFRP2遺伝子の変化の解析をさらにRT-PCRにより行なつた。

#### 【0061】

##### <材料および方法>

##### 1. 細胞および培養

マウス胚線維芽細胞(MEF)は、D<sub>1</sub>g+/+マウスおよびD<sub>1</sub>g−/−マウスの1

3. 5日目の胚から調製した。また、永久増殖性MEFを、調製した初生MEFから既に確立された手法により作製した。MEFは10%牛胎児血清(FBS)および抗生物質を含むDMEM中で培養した。

#### 【0062】

#### 2. D1gをトランスフェクションしたMEFのAuto-MACSによる濃縮

D1g-/—永久増殖性MEFに、マウスD1g遺伝子を発現させるベクターpMKittneo-D1gを用いてD1gをトランスフェクションした。このとき、D1gをトランスフェクションしたMEFを選択的に濃縮するため、pMKittneo-D1gと共に、短縮したH2-kk分子(その遺伝子の塩基配列を配列番号10に示した)を発現させるベクターpMACSKkIIをコトランスフェクションした。コトランスフェクション24時間後にMEFを回収し、BPE(5mMエチレンジアミン四酢酸(EDTA)を含むPBS)に再懸濁し、MACSellect kkミクロビーズと共に15分間インキュベーションした後、磁気分離した。

#### 【0063】

#### 3. RT-PCR分析

MEFから、総RNAをISOGENE(Nippon Gene社製)を用いて抽出した。総RNA(5μg)を用い、Superscript III逆転写酵素(Invitrogen社製)を使用して、使用説明書にしたがってcDNAを調製した。PCRは次の運転条件で行なった：94℃で1分間；次いで、94℃で30秒間そして55℃で30秒間に続いて72℃で1分間を1サイクルとして30サイクル；そして最終サイクルの後で、72℃で10分間の最終伸張反応。

#### 【0064】

#### <結果>

MEFは、2系統のマウス(#33および#44)からそれぞれ調製した(#33primaryおよび#44primary)。#33および#44はそれぞれ、ターゲティングベクターをエレクトロボレーションによりトランスフェクションした後に数枚のディッシュに細胞を播種して薬剤選別を行なった後に別々のディッシュから取得したクローンを用いて作製したマウス系統である。#33由来のMEFから、永久増殖性MEFを作製した(#33immortalized)。D1g+/+MEFおよびD1g-/—MEFから抽出した各RNA試料について、sFRP1およびsFRP2の発現をRT-PCRにより検討した。また、コントロールとしてアクチンの発現を同様に検討した。

#### 【0065】

これら3種類のMEFのいずれにおいても、D1g-/—ではD1g+/+と比較して、sFRP1 mRNAおよびsFRP2 mRNAが減少していた(図3)。sFRP2 mRNAの減少は、sFRP1 mRNAと比較して、より顕著であって。アクチンmRNAの量に変化はなかった。

#### 【0066】

D1g+/+由来永久増殖性MEF、D1g-/—由来永久増殖性MEFおよびD1gをトランスフェクションしたD1g-/—由来永久増殖性MEFから抽出した各RNA試料について、sFRP2およびsFRP1の発現をRT-PCRにより検討した。また、各細胞を用いてD1gの検出をウエスタンプロットティングにより行なった。その結果、D1g+/+由来永久増殖性MEFでは、D1gが検出されたが、D1g-/—由来永久増殖性MEFでは全く検出されず、D1g遺伝子を導入したD1g-/—由来永久増殖性MEFではD1g+/+由来永久増殖性MEFと比べて量的には少ないがD1gが検出された(図4)。sFRP2 mRNAは、D1g-/—由来永久増殖性MEFにおいて、D1g+/+由来永久増殖性MEFと比較して著しく減少していた(図4)。D1g遺伝子を導入したD1g-/—由来永久増殖性MEFでは、D1g遺伝子を導入しなかったものと比較して、sFRP2 mRNAが増加した(図4)。

#### 【0067】

これら結果から、D1gの欠損により、sFRP1およびsFRP2の発現、特にsF

R P 2 の発現が阻害されることが判明した。また、D 1 g 遺伝子の導入により、s F R P 2 の発現を増強することが可能であることが明らかになった。

### 【産業上の利用可能性】

#### 【0068】

本発明は、腫瘍形成、例えば皮膚腫瘍やリンパ腫等の形成のメカニズムを分子レベルで解明する目的に有用である。さらに腫瘍形成の阻害剤や阻害方法の開発、並びに癌疾患の防止剤、治療剤、防止方法または治療方法の開発等のために利用可能である。本発明は、このように、医薬研究や医薬開発分野等において非常に有用性が高い。

### 【図面の簡単な説明】

#### 【0069】

【図1-A】ターゲティング構築物（図中、Targeting vectorと表示）、D 1 g 遺伝子座（図中、D 1 g Locusと表示）、および遺伝子導入された対立遺伝子（図中、D 1 g recombinantと表示）を示す図である。ネオマイシン耐性遺伝子（neo）はC 1 a I 部位にインフレーム融合により挿入した；その5'側および3'側にはそれぞれ0.8 kb および8.5 kb の相同配列が隣接している（太線で表示）。細線はp Blue script由来の配列を表わす。サザンプロット分析に用いた5'プローブ（5' probe）の位置は、図の下部に、ハイブリダイゼーションする断片の予想サイズと共に表した。図中「B」はBamH I、「C」はC 1 a I、「E」はEcoRI、および「X」はXbaI を意味する。また、矢印およびATGはD 1 g のコード領域開始部分を示す。

【図1-B】第3代目のD 1 g +/+マウス、D 1 g +/-マウスおよびD 1 g -/-マウスの尾由来DNAを、5'プローブを用いてサザンプロット分析した代表的結果を示す図である。

【図1-C】第3代目のD 1 g +/+マウス、D 1 g +/-マウスおよびD 1 g -/-マウスの遺伝子型を、各マウスの尾由来DNAを用いて解析した結果を示す図である。図中、「wild-type」は野生型のD 1 g 遺伝子を、「mutant」は変異が導入されたD 1 g 遺伝子を示す。

【図1-D】第3代目のD 1 g +/+マウス、D 1 g +/-マウスおよびD 1 g -/-マウスにおけるD 1 g の発現を、新生児マウスの脳溶解物を用いてイムノプロッティングにより解析した結果を示す図である。

【図2-A】D 1 g +/+マウスのリンパ節には、FITC結合抗CD56抗体で染色される細胞が極少ないことをフローサイトメトリーにより明らかにした図である。図中、FL1-HeightはFITC結合抗CD56抗体による染色強度を表す。また、R 2で示される領域（図中右側の四角で囲まれた領域）に存在するドットは、FITC結合抗CD56抗体で染色された細胞を、R 3で示される領域（図中左側の四角で囲まれた領域）に存在するドットは、FITC結合抗CD56抗体で染色されなかった細胞を示す。

【図2-B】D 1 g +/-マウスの腫瘍が形成されたリンパ節には、FITC結合抗CD56抗体で染色される細胞の著しい増加が認められたことをフローサイトメトリーにより明らかにした図である。図中、FL1-HeightはFITC結合抗CD56抗体による染色強度を表す。また、R 2で示される領域（図中右側の四角で囲まれた領域）に存在するドットは、FITC結合抗CD56抗体で染色された細胞を、R 3で示される領域（図中左側の四角で囲まれた領域）に存在するドットは、FITC結合抗CD56抗体で染色されなかった細胞を示す。

【図3】s F R P 1 およびs F R P 2 の発現が、D 1 g +/+MEF と比較して、D 1 g -/-MEF において低減していたことを各MEFから抽出したRNA試料を用いてRT-PCRにより明らかにした図である。アクチンは発現のコントロールである。検討には、2系統のマウス（# 33 および# 44）からそれぞれ調製したMEF（# 33 primary および# 44 primary）、および# 33 由来のMEFから作製した永久増殖性MEF（# 33 immortalized）を用いた。こ

これらマウス系統は、ターゲティングベクターをES細胞にトランスフェクションして得られた2つのクローニーからそれぞれ作製した系統である。

【図4】sFRP2の発現が、D1g-/-由来永久増殖性MEF (D1g-/-MEF)において、D1g+/+由来永久増殖性MEF (D1g+/+MEF)比較して著しく低減したことを、RT-PCRにより明らかにした図である(下図)。また、D1g-/-由来永久増殖性MEFにD1g遺伝子をトランスフェクションすることにより(D1g-/-MEF:D1g)、sFRP2の発現が増強されることが判明した(下図)。D1g+/+MEFにおいては、D1gの発現が認められたが、D1g-/-MEFでは該発現が認められなかったことを、ウェスタンブロッティングにより確認した(上図)。また、D1g-/-MEF:D1gでは、D1g遺伝子のトランスフェクションによりD1gが発現したことが判明した(上図)。

#### 【配列表フリーテキスト】

##### 【0070】

配列番号1：ヒトD1g (discs large) 遺伝子。

配列番号2：ヒトD1g (discs large)。

配列番号3：マウスD1g (discs large) 遺伝子。

配列番号4：マウスD1g (discs large)。

配列番号5：プライマーとして使用するために設計されたオリゴスクレオチド。

配列番号6：プライマーとして使用するために設計されたオリゴスクレオチド。

配列番号7：プライマーとして使用するために設計されたオリゴスクレオチド。

配列番号8：プライマーとして使用するために設計されたオリゴスクレオチド。

配列番号9：プライマーとして使用するために設計されたオリゴスクレオチド。

配列番号10：H2-kk遺伝子。

## 【配列表】

## SEQUENCE LISTING

<110> DAIICHI PHARMACEUTICAL CO., LTD.

<120> An agent for enhancing expression of sFRP

<130> NP04-1026

<160> 10

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 2980

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc-feature

<223> humanDlg(discs large) gene

<400> 1

gttggaaacg gcactgctga gtgaggttga ggggtgtctc ggtatgtgcg ctttgatct 60

ggtgttaggcg aggtcacgccc tctcttcaga cagcccgagc ctccccggcc tggcgcgttt 120

agttcggAAC tgcgggacgc cgggtggcta gggcaagggtg tgtgccctct tcctgattct 180

ggagaaaaat gccgggtccgg aagcaagata cccagagagc attgcacctt ttggaggaat 240

atcgttcaaa actaagccaa actgaagaca gacagctcag aagttccata gaacgggtta 300

ttaacatatt tcagagcaac ctctttcagg ctttaataga tattcaagaa ttttatgaag 360

tgaccttact ggataatcca aaatgtatag atcgttcaaa gccgtctgaa ccaattcaac 420

ctgtgaatac ttgggagatt tccagccttc caagctctac tgtgacttca gagacactgc 480

caagcagcct tagccctagt gtagagaaaat acaggtatca ggtgaagat acacccctc 540

aagagcatat ttccccacaa atcacaatg aagtgtatgg tccagaattg gttcatgtct 600

cagagaagaa cttatcagag attgagaatg tccatggatt tgtttctcat tctcatatTT 660

caccaataaa gccaacagaa gctgtcttc cctctccctcc cactgtccct gtgatccctg 720

tctgtccagt ccctgctgag aatactgtca tcctaccac cataccacag gcaaattcctc 780

ccccagtagt ggtcaacaca gatagcttgg aaacacccaac ttacgttaat ggcacagatg 840  
cagattatga atatgaagaa atcacacttg aaaggggaaa ttcagggtt ggttcagca 900  
ttgcaggagg tacggacaac ccacacattg gagatgactc aagtatttc attacaaaa 960  
ttatcacagg gggagcagcc gcccaagatg gaagattgcg ggtcaatgac tgtatattac 1020  
aagtaaatga agtagatgtt cgtgatgtaa cacatagcaa agcagttgaa gcgttgaag 1080  
aaggcagggtc tattgtacgc ttgtatgtaa aaagaaggaa accagtgta gaaaaataaa 1140  
tggaaataaa gctcattaaa ggtcctaaag gtcttggtt tagcattgtt ggaggtgtt 1200  
gaaatcagca tattcctgg gataatagca tctatgtAAC caaaataatt gaaggaggtg 1260  
cagcacataa ggatggcaaa cttagattg gagataaact tttagcagtg aataacgtat 1320  
gtttagaaga agttactcat gaagaagcag taactgcctt aaagaacaca tctgatTTG 1380  
tttatTTGAA agtggcaaaa cccacaagta tgtatATGAA tgatggctat gcaccacTG 1440  
atatcaccaa ctttttct cagcctgttG ataaccatgt tagccatct tccttcttgg 1500  
gccagacacc agcatctcca gccagatact ccccagttc taaagcagta ctggagatg 1560  
atgaaattac aagggAACCT agaaaAGTTG ttcttcatcg tggctcaacg ggccttggTT 1620  
tcaacattgt aggaggagaa gatggagaag gaatatttAT ttccTTTATC tttagccggag 1680  
gacctgctGA tctaagtggA gagctcagaa aaggagatcg tattatATCG gtaaacagtg 1740  
ttgacctcAG agctgctAGT catgagcagg cagcagctgc attgaaaaAT gctggccagg 1800  
ctgtcacaat tgTTGcacaA tatcgacctg aagaatacag tcgtttGAA gctaaaatac 1860  
atgatTTACG ggagcagatg atgaatagta gtattAGTTc agggtcaggt tctctTCGAA 1920  
ctagccagaa gcgatccCTC tatgtcagag cccttttGA ttatgacaAG actaaAGACA 1980  
gtggcTTCC cagtcaGGGA ctgaacttca aatttggaga tattttccat gttattaatG 2040  
cttctgtatGA tgaatggTGG caagccaggc aggttacacc agatggtgag agcgatgagg 2100  
tcggagtgat tcccagtaaa cgcaGAGTTG agaagaAGA acgagccccGA ttAAAAACAG 2160  
tgaaaATTCAA ttctAAAACG agagataaAG gggagatccc tgacgacatg ggatcaaaaAG 2220  
gcctgaAGCA tgtaacttct aatgcccAGCG atagtgAAAG tagttaccGT ggtcaAGAAG 2280

aatacgtctt atcttatgaa ccagtgaatc aacaagaagt taattatact cgaccagtga	2340
tcatattggg accttatgaaa gacaggataa atgatgactt gatctcagaa tttcctgaca	2400
aatttggatc ctgtgttcct catacaacta gacaaaaacg agattatgag gttagatggaa	2460
gagattatca ttttgtgact tcaagagagc agatggaaaa agatatccag gaacataaat	2520
tcattgaagc tggccagtat aacaatcatc tatatggaac aagtgttcag tctgtacgag	2580
aagtagcagg aaagggcaaa cactgtatcc ttgatgtgtc tggaaatgcc ataaagagat	2640
taaaaaaaaaaaaaacagattgc acagctttac cctatctcca tttttattaa acccaaattcc atggaaaata	2700
tcatggaaat gaataagcgt ctaacagaag aacaaggccag aaaaacattt gagagagccca	2760
tgaaactgga acaggagttt actgaacatt tcacagctat tgtacagggg gatacgctgg	2820
aagacattta caaccaagtg aaacagatca tagaagaaca atctggttct tacatctggg	2880
ttccggcaaa agaaaagcta tgaaaactca tgtttctctg ttctctttt ccacaattcc	2940
attttcttgc gcatctcttt gccctttcct ctggaaaaaa	2980

<210> 2  
 <211> 904  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> misc-feature  
 <223> human Dlg (discs large)

<400> 2

Met Pro Val Arg Lys Gln Asp Thr Gln Arg Ala Leu His Leu Leu Glu			
1	5	10	15

Glu Tyr Arg Ser Lys Leu Ser Gln Thr Glu Asp Arg Gln Leu Arg Ser		
20	25	30

Ser Ile Glu Arg Val Ile Asn Ile Phe Gln Ser Asn Leu Phe Gln Ala		
35	40	45

Leu Ile Asp Ile Gln Glu Phe Tyr Glu Val Thr Leu Leu Asp Asn Pro	
---	--

50

55

60

Lys Cys Ile Asp Arg Ser Lys Pro Ser Glu Pro Ile Gln Pro Val Asn  
65 70 75 80

Thr Trp Glu Ile Ser Ser Leu Pro Ser Ser Thr Val Thr Ser Glu Thr  
85 90 95

Leu Pro Ser Ser Leu Ser Pro Ser Val Glu Lys Tyr Arg Tyr Gln Asp  
100 105 110

Glu Asp Thr Pro Pro Gln Glu His Ile Ser Pro Gln Ile Thr Asn Glu  
115 120 125

Val Ile Gly Pro Glu Leu Val His Val Ser Glu Lys Asn Leu Ser Glu  
130 135 140

Ile Glu Asn Val His Gly Phe Val Ser His Ser His Ile Ser Pro Ile  
145 150 155 160

Lys Pro Thr Glu Ala Val Leu Pro Ser Pro Pro Thr Val Pro Val Ile  
165 170 175

Pro Val Leu Pro Val Pro Ala Glu Asn Thr Val Ile Leu Pro Thr Ile  
180 185 190

Pro Gln Ala Asn Pro Pro Val Leu Val Asn Thr Asp Ser Leu Glu  
195 200 205

Thr Pro Thr Tyr Val Asn Gly Thr Asp Ala Asp Tyr Glu Tyr Glu Glu  
210 215 220

Ile Thr Leu Glu Arg Gly Asn Ser Gly Leu Gly Phe Ser Ile Ala Gly  
225 230 235 240

Gly Thr Asp Asn Pro His Ile Gly Asp Asp Ser Ser Ile Phe Ile Thr  
245 250 255

Lys Ile Ile Thr Gly Gly Ala Ala Ala Gln Asp Gly Arg Leu Arg Val  
260 265 270

Asn Asp Cys Ile Leu Gln Val Asn Glu Val Asp Val Arg Asp Val Thr  
275 280 285

His Ser Lys Ala Val Glu Ala Leu Lys Glu Ala Gly Ser Ile Val Arg  
290 295 300

Leu Tyr Val Lys Arg Arg Lys Pro Val Ser Glu Lys Ile Met Glu Ile  
305 310 315 320

Lys Leu Ile Lys Gly Pro Lys Gly Leu Gly Phe Ser Ile Ala Gly Gly  
325 330 335

Val Gly Asn Gln His Ile Pro Gly Asp Asn Ser Ile Tyr Val Thr Lys  
340 345 350

Ile Ile Glu Gly Gly Ala Ala His Lys Asp Gly Lys Leu Gln Ile Gly  
355 360 365

Asp Lys Leu Leu Ala Val Asn Asn Val Cys Leu Glu Glu Val Thr His  
370 375 380

Glu Glu Ala Val Thr Ala Leu Lys Asn Thr Ser Asp Phe Val Tyr Leu  
385 390 395 400

Lys Val Ala Lys Pro Thr Ser Met Tyr Met Asn Asp Gly Tyr Ala Pro  
405 410 415

Pro Asp Ile Thr Asn Ser Ser Gln Pro Val Asp Asn His Val Ser  
420 425 430

Pro Ser Ser Phe Leu Gly Gln Thr Pro Ala Ser Pro Ala Arg Tyr Ser  
435 440 445

Pro Val Ser Lys Ala Val Leu Gly Asp Asp Glu Ile Thr Arg Glu Pro

450

455

460

Arg Lys Val Val Leu His Arg Gly Ser Thr Gly Leu Gly Phe Asn Ile  
465 470 475 480

Val Gly Gly Glu Asp Gly Glu Gly Ile Phe Ile Ser Phe Ile Leu Ala  
485 490 495

Gly Gly Pro Ala Asp Leu Ser Gly Glu Leu Arg Lys Gly Asp Arg Ile  
500 505 510

Ile Ser Val Asn Ser Val Asp Leu Arg Ala Ala Ser His Glu Gln Ala  
515 520 525

Ala Ala Ala Leu Lys Asn Ala Gly Gln Ala Val Thr Ile Val Ala Gln  
530 535 540

Tyr Arg Pro Glu Glu Tyr Ser Arg Phe Glu Ala Lys Ile His Asp Leu  
545 550 555 560

Arg Glu Gln Met Met Asn Ser Ser Ile Ser Ser Gly Ser Gly Ser Leu  
565 570 575

Arg Thr Ser Gln Lys Arg Ser Leu Tyr Val Arg Ala Leu Phe Asp Tyr  
580 585 590

Asp Lys Thr Lys Asp Ser Gly Leu Pro Ser Gln Gly Leu Asn Phe Lys  
595 600 605

Phe Gly Asp Ile Leu His Val Ile Asn Ala Ser Asp Asp Glu Trp Trp  
610 615 620

Gln Ala Arg Gln Val Thr Pro Asp Gly Glu Ser Asp Glu Val Gly Val  
625 630 635 640

Ile Pro Ser Lys Arg Arg Val Glu Lys Lys Glu Arg Ala Arg Leu Lys  
645 650 655

Thr Val Lys Phe Asn Ser Lys Thr Arg Asp Lys Gly Glu Ile Pro Asp  
660 665 670

Asp Met Gly Ser Lys Gly Leu Lys His Val Thr Ser Asn Ala Ser Asp  
675 680 685

Ser Glu Ser Ser Tyr Arg Gly Gln Glu Glu Tyr Val Leu Ser Tyr Glu  
690 695 700

Pro Val Asn Gln Gln Glu Val Asn Tyr Thr Arg Pro Val Ile Ile Leu  
705 710 715 720

Gly Pro Met Lys Asp Arg Ile Asn Asp Asp Leu Ile Ser Glu Phe Pro  
725 730 735

Asp Lys Phe Gly Ser Cys Val Pro His Thr Thr Arg Pro Lys Arg Asp  
740 745 750

Tyr Glu Val Asp Gly Arg Asp Tyr His Phe Val Thr Ser Arg Glu Gln  
755 760 765

Met Glu Lys Asp Ile Gln Glu His Lys Phe Ile Glu Ala Gly Gln Tyr  
770 775 780

Asn Asn His Leu Tyr Gly Thr Ser Val Gln Ser Val Arg Glu Val Ala  
785 790 795 800

Gly Lys Gly Lys His Cys Ile Leu Asp Val Ser Gly Asn Ala Ile Lys  
805 810 815

Arg Leu Gln Ile Ala Gln Leu Tyr Pro Ile Ser Ile Phe Ile Lys Pro  
820 825 830

Lys Ser Met Glu Asn Ile Met Glu Met Asn Lys Arg Leu Thr Glu Glu  
835 840 845

Gln Ala Arg Lys Thr Phe Glu Arg Ala Met Lys Leu Glu Gln Glu Phe

850

855

860

Thr Glu His Phe Thr Ala Ile Val Gln Gly Asp Thr Leu Glu Asp Ile  
 865 870 875 880

Tyr Asn Gln Val Lys Gln Ile Ile Glu Glu Gln Ser Gly Ser Tyr Ile  
 885 890 895

Trp Val Pro Ala Lys Glu Lys Leu  
 900

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 3150

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; misc-feature

&lt;223&gt; murineDlg(discs large) gene

&lt;400&gt; 3

ggagaaaaat gccgggtccgg aagcaagata cccagagagc attgcatctg ttggagaat 60

atcgatcgaa actaagccaa actgaagaca gacaactcag aagttccata gagcgggtta 120

ttaacatatt tcagagcaac ctctttcagg ctttaataga tattcaagaa ttttatgaag 180

tgaccttact tgataatcca aaatgtgtgg atcattcaaa gcagtggtgaa ccagttcagc 240

ctgtgactac ttgggagatt gccagccttc caagcactgc cgtgacgtca gaaaccctgc 300

ccggcagcct tagccctcca gtagagaaaat accggtatca ggatgaagag gtacttcctc 360

ctgagcatat ttctccacaa gtcacaaaatg aggtgctagg tccagaactg gtccatgtct 420

cagagaagaa cctgtcagag attgagaatg tccatggatt ttttctcat tctcatatct 480

caccaataaa gcccacagaa gctgttcctc cctcctctcc cattgtccct gtgaccctgc 540

ccctgccagt ccctgctgag agtactgtcg tcctgccctc cgccaccacag gcaaattcctc 600

ctccagtgct ggtcaacaca gacagcttag agacaccaac ttatgttaat ggcactgatg 660

cagattatga atatgaggaa atcacacttg aaaggggaaa ttctgggtctt ggtttcagca 720

ttgcaggagg tacagacaac ccacacattg gagatgactc aagtatttc atcacaaaa 780  
ttatcacagg cggacgggct gcccaggatg gaagattgcg gtaaatgac tgtgtactga 840  
gagtaaatga agcagacgtt cgtgatgtaa cccacagcaa agcagtgagg gcattaaaag 900  
aagctggatc tattgtgcga ttgtatgtga aaaggcgaa gctagcatca gaaaaaatca 960  
tggaaataaa gtcattaaa ggtcctaaag gtcttggtt cagcattgct ggaggtattg 1020  
gaaatcagca cattcctggt gataacagca tctatgtaac caaaataatt gaaggaggtg 1080  
cagcacacaa ggatggcaag cttagattg gagataagct tctagcagt aacagtgtgt 1140  
gtttagaaga agttaactcat gaagaagcag tgactgcctt aaagaataca tctgatttg 1200  
tttatttcaa agtggcaaaa ccaacaagta tgtatataaa tgatggctat gcaccacctg 1260  
acatcactaa ttcttcttct caatctgttg acaaccatgt cagcccggtcc tcctgcttgg 1320  
gccagacgcc aacgtcacca gccaggtact cacccatttc taaagctgtg ctggagatg 1380  
acgagatcac taggaaacct agaaaagttt gttttcatcg tgctcaaca ggacttggtt 1440  
ttaacattgt ggcagggtgaa gatggagaag ggattttat ctcttcatc cttgctggcg 1500  
gacctgctga tctaagtggaa gagctcagaa aaggagatcg catcatatcg gtgaacagtg 1560  
ttgacctcag agctgcaagt cacgaacaag cagcagctgc actaaagaac gcaggccaag 1620  
ccgtcaccat cggtgcgcaa tatcgacccg aagagtcacg tggtttggaa gctaaaatcc 1680  
atgacttacg ggagcagatg atgaatagca gagtcagttc agggtcagggt ctctctcgaa 1740  
ccagccagaa gcgcctccctc tatgtcagag ccctctttga ttatgacaag actaaggaca 1800  
gcgggcttcc cagtcagga ctgaacttcc gctttggaga catcctccat gtcataatg 1860  
cttctgacga cgagtggtgg caagccaggc aggtcacccc agacggggag agtgacgaag 1920  
tcggagtgat tcctagtaaa cgaagagctg agaagaagga acgagccccg ttaaaaacgg 1980  
tcaaattcaa ttctaaaaca agaggagata aagggcagtc attcaatgac aagcgtaaaa 2040  
agaacctctt ttcccgaaaa ttcccttct acaagaacaa ggaccagagt gaacaggaaa 2100  
cgagtgatgc tgaccagcac gtaacttcta atgccagcga tagtgaaagt agttaccgtg 2160  
gtcaagaaga atgtgttttta tcttatgagc cagtgaaatca acaagaagtt aattataccc 2220

gaccagtcat	catatttagga	cctatgaaag	acagagtaaa	tgatgactta	atctcagaat	2280
ttcctgacaa	atttggatcc	tgtgtccctc	atacaactag	accgaagggt	gacatagagg	2340
tggatggacg	agattatcat	tttgtgactt	caagggAACG	agtggaaaag	gatattcagg	2400
agcataagtt	cattgaagcc	ggccaggtata	acaaccatct	gtatggacg	agcggtgcagt	2460
ccgtgcgagc	agtggcagag	aaggcAACAC	attgtatcct	tgatgtgtct	ggaaatgcac	2520
taaagaggtt	gcagattgca	cagctttatc	caatatctat	ttttattaaa	cccaaatcca	2580
tggaaaatat	catggaaatg	aacaagcgcc	taacagaaga	gcaggccaga	aaaacatttg	2640
agagagccat	gaagctggag	caggagttca	ctgagcattt	cacagctatt	gtccaggag	2700
acacgctgga	ggacatTTAC	aaccaagtga	aacagatcat	cgaagaacag	tctgggcctt	2760
acatctgggt	cctagcgaaa	gaaaagctat	gaagacggat	gttgttcttt	cttttttcca	2820
tggtctcatac	tcttgccctg	ttgtggagtc	tgtcttcgg	gtcctccacg	ctgacacaga	2880
tccccctcctc	atggtcggca	gttgtgcccc	ttttttgaca	tctgtgtccc	ttcatgttgc	2940
atcatctgtat	ctattctgtg	ttactcttgg	tttctggcca	cttttcggaa	tgaagatgaa	3000
tggcctgacc	agctatctag	ggtttgggga	gatgtaaaat	tgtaaaatTC	cttaatgttt	3060
aagggaaagt	taactttaag	agatTTTcag	aaaagcttta	tatacactct	tttccaatct	3120
cagtacaaat	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa				3150

<210> 4  
 <211> 927  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<220>  
 <221> misc-feature  
 <223> murine Dlg (discs large)

<400> 4

Met	Pro	Val	Arg	Lys	Gln	Asp	Thr	Gln	Arg	Ala	Leu	His	Leu	Leu	Glu
1															

Glu	Tyr	Arg	Ser	Lys	Leu	Ser	Gln	Thr	Glu	Asp	Arg	Gln	Leu	Arg	Ser
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

20

25

30

Ser Ile Glu Arg Val Ile Asn Ile Phe Gln Ser Asn Leu Phe Gln Ala  
35 40 45

Leu Ile Asp Ile Gln Glu Phe Tyr Glu Val Thr Leu Leu Asp Asn Pro  
50 55 60

Lys Cys Val Asp His Ser Lys Gln Cys Glu Pro Val Gln Pro Val Thr  
65 70 75 80

Thr Trp Glu Ile Ala Ser Leu Pro Ser Thr Ala Val Thr Ser Glu Thr  
85 90 95

Leu Pro Gly Ser Leu Ser Pro Pro Val Glu Lys Tyr Arg Tyr Gln Asp  
100 105 110

Glu Glu Val Leu Pro Pro Glu His Ile Ser Pro Gln Val Thr Asn Glu  
115 120 125

Val Leu Gly Pro Glu Leu Val His Val Ser Glu Lys Asn Leu Ser Glu  
130 135 140

Ile Glu Asn Val His Gly Phe Val Ser His Ser His Ile Ser Pro Ile  
145 150 155 160

Lys Pro Thr Glu Ala Val Pro Pro Ser Ser Pro Ile Val Pro Val Thr  
165 170 175

Pro Ala Leu Pro Val Pro Ala Glu Ser Thr Val Val Leu Pro Ser Ala  
180 185 190

Pro Gln Ala Asn Pro Pro Pro Val Leu Val Asn Thr Asp Ser Leu Glu  
195 200 205

Thr Pro Thr Tyr Val Asn Gly Thr Asp Ala Asp Tyr Glu Tyr Glu Glu  
210 215 220

Ile Thr Leu Glu Arg Gly Asn Ser Gly Leu Gly Phe Ser Ile Ala Gly  
225 230 235 240

Gly Thr Asp Asn Pro His Ile Gly Asp Asp Ser Ser Ile Phe Ile Thr  
245 250 255

Lys Ile Ile Thr Gly Gly Arg Ala Ala Gln Asp Gly Arg Leu Arg Val  
260 265 270

Asn Asp Cys Val Leu Arg Val Asn Glu Ala Asp Val Arg Asp Val Thr  
275 280 285

His Ser Lys Ala Val Glu Ala Leu Lys Glu Ala Gly Ser Ile Val Arg  
290 295 300

Leu Tyr Val Lys Arg Arg Lys Leu Ala Ser Glu Lys Ile Met Glu Ile  
305 310 315 320

Lys Leu Ile Lys Gly Pro Lys Gly Leu Gly Phe Ser Ile Ala Gly Gly  
325 330 335

Ile Gly Asn Gln His Ile Pro Gly Asp Asn Ser Ile Tyr Val Thr Lys  
340 345 350

Ile Ile Glu Gly Gly Ala Ala His Lys Asp Gly Lys Leu Gln Ile Gly  
355 360 365

Asp Lys Leu Leu Ala Val Asn Ser Val Cys Leu Glu Glu Val Thr His  
370 375 380

Glu Glu Ala Val Thr Ala Leu Lys Asn Thr Ser Asp Phe Val Tyr Leu  
385 390 395 400

Lys Val Ala Lys Pro Thr Ser Met Tyr Ile Asn Asp Gly Tyr Ala Pro  
405 410 415

Pro Asp Ile Thr Asn Ser Ser Gln Ser Val Asp Asn His Val Ser

420

425

430

Pro Ser Ser Cys Leu Gly Gln Thr Pro Thr Ser Pro Ala Arg Tyr Ser  
435 440 445

Pro Ile Ser Lys Ala Val Leu Gly Asp Asp Glu Ile Thr Arg Glu Pro  
450 455 460

Arg Lys Val Val Leu His Arg Gly Ser Thr Gly Leu Gly Phe Asn Ile  
465 470 475 480

Val Ala Gly Glu Asp Gly Glu Gly Ile Phe Ile Ser Phe Ile Leu Ala  
485 490 495

Gly Gly Pro Ala Asp Leu Ser Gly Glu Leu Arg Lys Gly Asp Arg Ile  
500 505 510

Ile Ser Val Asn Ser Val Asp Leu Arg Ala Ala Ser His Glu Gln Ala  
515 520 525

Ala Ala Ala Leu Lys Asn Ala Gly Gln Ala Val Thr Ile Val Ala Gln  
530 535 540

Tyr Arg Pro Glu Glu Ser Arg Arg Phe Glu Ala Lys Ile His Asp Leu  
545 550 555 560

Arg Glu Gln Met Met Asn Ser Arg Val Ser Ser Gly Ser Gly Ser Pro  
565 570 575

Arg Thr Ser Gln Lys Arg Ser Leu Tyr Val Arg Ala Leu Phe Asp Tyr  
580 585 590

Asp Lys Thr Lys Asp Ser Gly Leu Pro Ser Gln Gly Leu Asn Phe Arg  
595 600 605

Phe Gly Asp Ile Leu His Val Ile Asn Ala Ser Asp Asp Glu Trp Trp  
610 615 620

Gln Ala Arg Gln Val Thr Pro Asp Gly Glu Ser Asp Glu Val Gly Val  
625 630 635 640

Ile Pro Ser Lys Arg Arg Ala Glu Lys Lys Glu Arg Ala Arg Leu Lys  
645 650 655

Thr Val Lys Phe Asn Ser Lys Thr Arg Gly Asp Lys Gly Gln Ser Phe  
660 665 670

Asn Asp Lys Arg Lys Lys Asn Leu Phe Ser Arg Lys Phe Pro Phe Tyr  
675 680 685

Lys Asn Lys Asp Gln Ser Glu Gln Glu Thr Ser Asp Ala Asp Gln His  
690 695 700

Val Thr Ser Asn Ala Ser Asp Ser Glu Ser Ser Tyr Arg Gly Gln Glu  
705 710 715 720

Glu Cys Val Leu Ser Tyr Glu Pro Val Asn Gln Gln Glu Val Asn Tyr  
725 730 735

Thr Arg Pro Val Ile Ile Leu Gly Pro Met Lys Asp Arg Val Asn Asp  
740 745 750

Asp Leu Ile Ser Glu Phe Pro Asp Lys Phe Gly Ser Cys Val Pro His  
755 760 765

Thr Thr Arg Pro Lys Arg Asp Ile Glu Val Asp Gly Arg Asp Tyr His  
770 775 780

Phe Val Thr Ser Arg Glu Arg Val Glu Lys Asp Ile Gln Glu His Lys  
785 790 795 800

Phe Ile Glu Ala Gly Gln Tyr Asn Asn His Leu Tyr Gly Thr Ser Val  
805 810 815

Gln Ser Val Arg Ala Val Ala Glu Lys Gly Lys His Cys Ile Leu Asp

820

825

830

Val Ser Gly Asn Ala Ile Lys Arg Leu Gln Ile Ala Gln Leu Tyr Pro  
835 840 845

Ile Ser Ile Phe Ile Lys Pro Lys Ser Met Glu Asn Ile Met Glu Met  
850 855 860

Asn Lys Arg Leu Thr Glu Glu Gln Ala Arg Lys Thr Phe Glu Arg Ala  
865 870 875 880

Met Lys Leu Glu Gln Glu Phe Thr Glu His Phe Thr Ala Ile Val Gln  
885 890 895

Gly Asp Thr Leu Glu Asp Ile Tyr Asn Gln Val Lys Gln Ile Ile Glu  
900 905 910

Glu Gln Ser Gly Pro Tyr Ile Trp Val Leu Ala Lys Glu Lys Leu  
915 920 925

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Designed polynucleotide for use as a primer

<400> 5

atgccccgtcc ggaaggcaaga 20

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Designed polynucleotide for use as a primer

<400> 6

tcttcatcct gataacctgta 20

<210> 7  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> Designed polynucleotide for use as a primer

<400> 7  
gctgtcagtc cacagctaac acaggctact 30

<210> 8  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> Designed polynucleotide for use as a primer

<400> 8  
tgtcctaagt taaggaccat ctagagagcc 30

<210> 9  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> Designed polynucleotide for use as a primer

<400> 9  
tcgtgcttta cggtatgcc gctcccgatt 30

<210> 10  
<211> 5229  
<212> DNA  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> misc-feature  
<223> H2-kk gene

<400> 10  
gaattcata tcactagta cgcgtcgacga gctcgatcc cggaaagctt cgatccagac 60

atgataagat acatttatgtga gtttggacaa accacaacta gaatgcaggtaaaaaaatgc 120  
tttattttgtg aaattttgtga tgctatttgct ttattttgtaa ccattataag ctgcaataaaa 180  
caagtttaaca acaacaatttgcattcatttt atgtttcagg ttcaggggga ggtgtgggag 240  
gttttttaaa gcaagtaaaa cctctacaaa tgtggtatgg ctgattatga tccggctgcc 300  
tcgcgcgttt cggtgatgac ggtgaaaacc tctgacacat gcagctccccg gagacggtca 360  
cagcttgtct gtaagcggat gccgggagca gacaagccccg tcagggcgcg tcagcgggtg 420  
ttggcggggtg tcggggcgca gccatgaccc ctgcatttaat gaatcggcca acgcgcgggg 480  
agaggcgggtt tgcgtattgg gcgctttcc gcttcctcgc tcactgactc gctgcgcctcg 540  
gtcgttcggc tgcggcgagc ggtatcagct cactcaaagg cgtaatacg gttatccaca 600  
gaatcagggg ataacgcagg aaagaacatg tgagcaaaag gccagcaaaa ggccaggaac 660  
cgtaaaaagg ccgcgttgct ggcgttttc cataggctcc gccccctga cgagcatcac 720  
aaaaatcgac gctcaagtca gaggtggcga aacccgacag gactataaag ataccaggcg 780  
tttccccctg gaagctccct cgtgcgcctc cctgttccga ccctgcccgt tacccgatac 840  
ctgtccgcct ttctcccttc gggaaagcgtg gcgctttctc atagctcactc tgtaggtat 900  
ctcagttcgg tgttaggtcgt tcgctccaag ctgggctgtg tgcacgaacc ccccgttcag 960  
cccgaccgct ggcgttatac cggtaactat cgtctttagt ccaacccggtaagacacac 1020  
ttatcgccac tggcagcagc cactggtaac aggattagca gagcggaggtatgttaggggt 1080  
gctacagagt tcttgaagtgt gtggcctaacc tacggctaca ctagaagaac agtattttgg 1140  
atctgcgcctc tgctgaagcc agttaccccttggaaaaagag ttggtagctc ttgatccggc 1200  
aaacaaacca ccgcgtggtag cggtggtttttttttgttgcagcagcagat tacgcgcaga 1260  
aaaaaaggat ctcaagaaga tcctttgtatc ttttctacgg ggtctgacgc tcagtgaaac 1320  
gaaaactcac gttaaaggat tttgctcatg agacaataac cctgataaat gcttcaataa 1380  
tattgaaaaa ggaagaggtat gagtattcaa cattttccgtg tcggcccttat tccctttttt 1440  
gcggcatttt gccttcctgt ttttgcctcacc cagaaaaacgc tggtgaaagt aaaagatgct 1500  
gaagatcagt tgggtgcacg agtgggttac atcgaactgg atctcaacag cggtaaagatc 1560

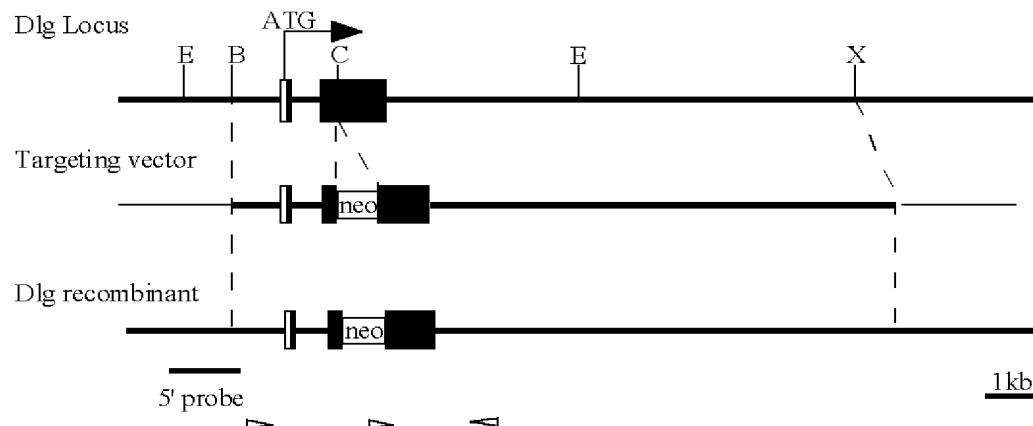
cttgagagtt ttccggccga agaacgtttt ccaatgatga gcactttaa agttctgcta 1620  
tgtggcgccg tattatccccg tattgacgccc gggcaagagc aactcggtcg ccgcatacac 1680  
tattctcaga atgacttggt tgagtactca ccagtcacag aaaagcatct tacggatggc 1740  
atgacagtaa gagaattatg cagtgctgcc ataaccatga gtgataaacac tgccggccaac 1800  
ttacttctga caacgatcg aggaccgaag gagctaaccg cttttttgc aacatgggg 1860  
gatcatgtaa ctgcgccttga tcgttggaa ccggagctga atgaaggccat accaaacgac 1920  
gagcgtgaca ccacgatgcc tgttagcaatg gcaacaacgt tgccaaact attaactggc 1980  
gaactactta ctctagcttc ccggcaacaa ttaatagact ggatggaggc ggataaagtt 2040  
gcaggaccac ttctgcgcctc ggcccttccg gctggctgg tattgctga taatctgg 2100  
gcgggtgagc gtgggtctcg cggtatcatt gcagcactgg ggccagatgg taagccctcc 2160  
cgtatcgtag ttatctacac gacggggagt caggcaacta tggatgaacg aaatagacag 2220  
atcgctgaga taggtgcctc actgatataag cattggtaac tgtcagacca agttactca 2280  
tatataacttt agattgattt aaaacctcat ttttaattta aaggatcta ggtgaagatc 2340  
cctagcttat cggccatttcc gatatcttta ttggatctct agagaaaatgt tctggcacct 2400  
gcacttgcac tggggacagc ctatttgct agtttggttt gttcggttt gtttggatgg 2460  
agagcgtatg ttccgttaccc cacacaaaaa accaacacac agatctaattt aaaaataaaga 2520  
tctttatg gatcggttgc ctaccctctt tttccacctg ttttctctt tctcatcttc 2580  
atcacaaaaag ccaccacagc tccagtgact attgcagctc caaggacaac cagaacagca 2640  
atgattacgg tggatggagac agtggatggg ggaggctccc atctcagggt gaggggctca 2700  
ggcagccctt gatggatcac acggcatgtg taatactgct cttcccaag aggccaccacc 2760  
acagatgcac acttctggaa gttccatcc cctgcaggcc tggtctccac aagctccatg 2820  
tcctgggtca gtcctcccc attcaactgc caggtcagggt gatgtcagc agggtagaaag 2880  
cccaggccc agcacctcag ggtgacttta tcttcagggtc tgctgtgacg ggtcacatgg 2940  
gcctttgggg aatctgtgcg cggcagcgtc gcggtcccgaa gctgcaggta tctgcggagc 3000  
cactccacgc acgtgcctc caggtaggcc cggtctctct ctgcataacc agcctgcctcc 3060

cacttgtgtt tggtgatcag cgccgccatg tcggccggcg tccacgttt caggtcttcg 3120  
ttcaggcgaa tgtaatcgca gccgtcgat gcgtactgct cgtacccgca gaggaggcgc 3180  
cagtccgacc ccacccataca gccgtacatc cgttggAACG tgtgagagcc gcccggctc 3240  
tggtttagt agcgcagcgc ggtcctcagg ttcaactcgga aaatctgctc attgcccttg 3300  
gcgatctgctg tttccgctc ccaataactcg ggctccacct gctccatcca ccgcacccgc 3360  
ggctcataacc tcggattctc cgcgtcgctg tcgaagcgc cgaactgcgt gtgcgtccacg 3420  
tagccgacag agatgaaccg gggcttcccc agggccgggccc gggacacggc ggtgtggaaa 3480  
tacctcagcg aatgtgggccc cgccgggtc tgagtcgggg ccagggcggc cgccaaacagc 3540  
aggagcagca tgcagggtgc catcgacccg gtcggcgatt cgagacttct gagttccgctg 3600  
ggctgcgtgg actttatagc cagcgtccgc ggccacactg attggttctt ggtgatcgctg 3660  
ccacccaatg gggtaagag ctgactgcgc gtcaacagtg tccggacaga aggacctgac 3720  
ccaggttagg agcagaagtg aaactgtgga gatgggaat ccccaagccct gggcttcccc 3780  
acccctgacc tcaccgcctg gcaactaaga ctttgcctga accctgtgt gtgcgtctccg 3840  
agttctgatc cagaaactct caaaacacca ggagagaccc gcaggccaga ctctctgtgt 3900  
cctctttcc actcttcctc ttcccttctc tcttcagaag tcagaccctg gagttttcta 3960  
gaagaaaagc ctcttccggg aatacaatgg tgacacaagc gcttagggat gcagtgagaga 4020  
gaggcttttc cttaaagtgc aggctctgg ctgcaagccc cacacggacc ccacagagac 4080  
caggctctgt tcacctgcaa tgggtggctc acactgc当地 gcctgagtg aggactcatc 4140  
tgtaagtgt agacttcgccc tctccctca ggatctgtct tctcagccct gtgcgtgagac 4200  
acagattcct tggtaatt cctagatgaa gagtctgtgg ctgcagggt gtgtgtgtgt 4260  
gtgtgtgtgt gtgtgtgtat ttgaaacaag gatcttcatt ctgagtcctg agtttgctc 4320  
tgtggacctg ggacattgtt tcagcacagg agacccctt gtccactgaa gagagacccc 4380  
tgtgcagacc acagacagca gggcactgat cgctgtctcc actggacttc tctgtgtctg 4440  
cacttccatg gtgcaggttgc tttagtgact taatcacagt aggagaggaa ctgtcaccaa 4500  
ctataacaca gaataaggat gatagtggtt tagaagttat gtaattctg accctctccc 4560

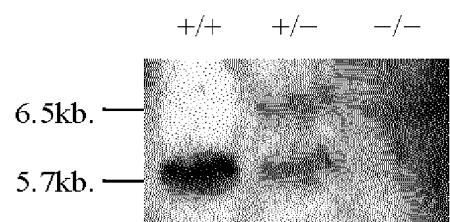
tccctccctg actttactc acacttatga gctgatgagg tgagggacat gaatgtcaca 4620  
gctgtgtggg acactggttc tgataaccta gttggccca gagttcctca ggggaattgg 4680  
ccgatgataa gctgtcaaac atgagaattt gtcgatcgac caattcttga agacgaaagg 4740  
gcctcggtat acgcctatTT ttataggtta atgtcatggg ccgataagct agcttggctg 4800  
tgaatgtgt gtcagttagg gtgtggaaag tccccaggct ccccagcagg cagaagtatg 4860  
caaagcatgc atctcaatta gtcagcaacc aggtgtggaa agtccccagg ctccccagca 4920  
ggcagaagta tgcaaagcat gcatactcaat tagtcagcaa ccatagtccc gcccctaact 4980  
ccgccccatcc cgccctaacc tccgcccagt tccgcccatt ctccgccccatggctgacta 5040  
atttttttta tttatgcaga ggccgaggcc gcctcgccct ctgagctatt ccagaagtag 5100  
tgaggaggct ttttggagg cctaggcttt tgcaaaaagc tcctcgagga actgaaaaac 5160  
cagaaagttt actggtaagt tttagtcttt tgtctttat ttcaaggccc ggatcggaat 5220  
tgccggccgc 5229

【書類名】 図面

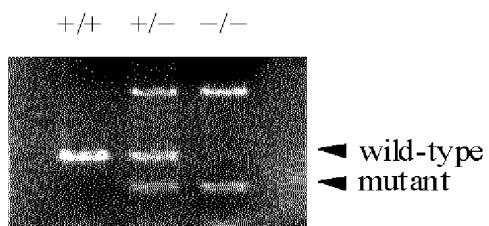
【図 1 - A】



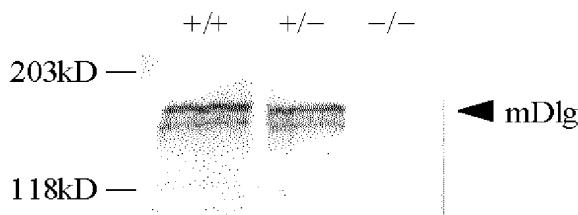
【図 1 - B】



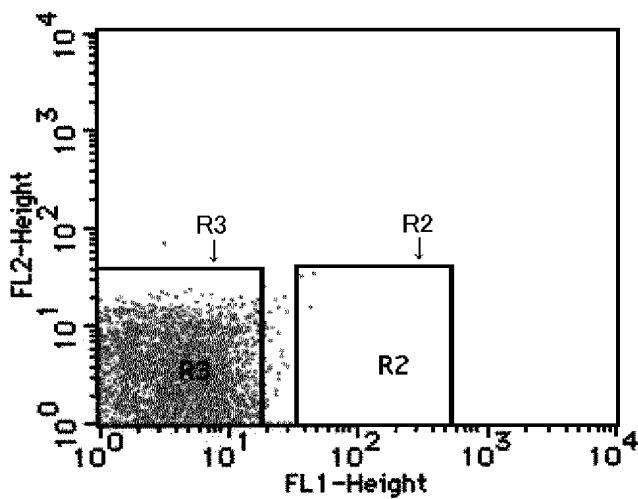
【図 1 - C】



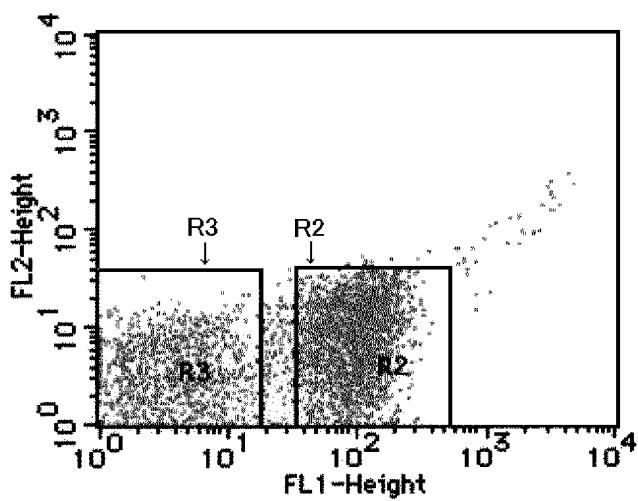
【図 1 - D】



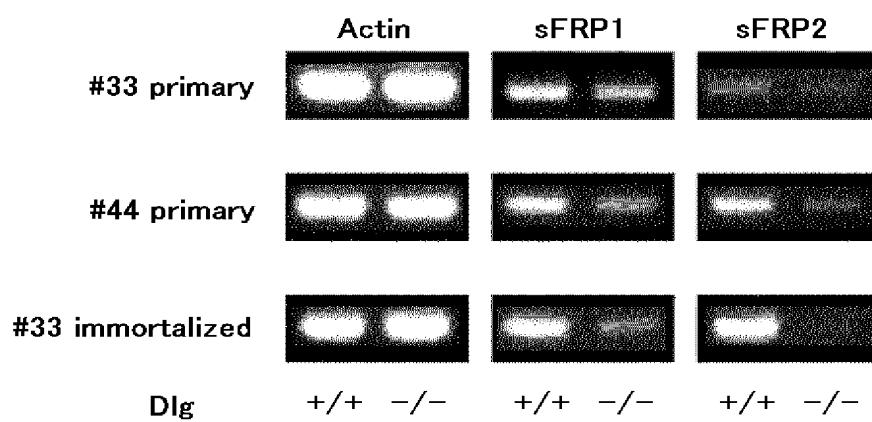
【図 2 - A】



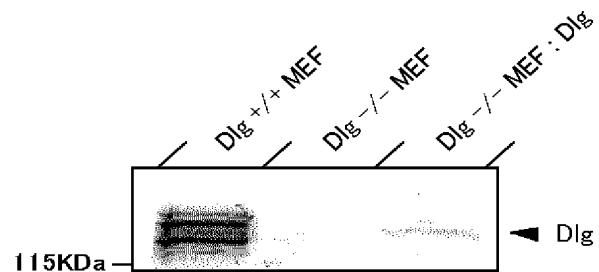
【図 2 - B】



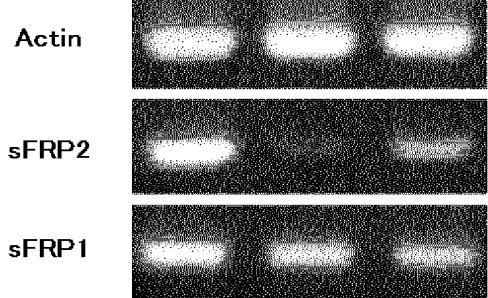
【図 3】



【図 4】



cycle - 30



【書類名】要約書

【要約】

【課題】 D1g の作用の調節手段および D1g 遺伝子の異常に起因する疾患の防止手段または治療手段の提供。

【解決手段】 D1g の発現および／または機能を増強する化合物を含む sFRP の発現増強剤および／または機能増強剤； D1g による sFRP の発現および／または機能を増強する化合物を含む抗腫瘍剤、腫瘍疾患の防止剤および／または治療剤； D1g の発現および／または機能を増強することを特徴とする sFRP の発現増強方法および／または機能増強方法； D1g による sFRP の発現および／または機能を増強することを特徴とする、腫瘍形成阻害方法、腫瘍疾患の防止方法および／または治療方法； D1g 対立遺伝子の一方または両方が欠損した非ヒト哺乳動物；該哺乳動物由来の細胞；該哺乳動物または該細胞を使用する、化合物の同定方法； D1g 遺伝子および／または D1g の発現および／または機能の測定による腫瘍組織または腫瘍細胞の検査方法。

出願人履歴

0 0 0 0 0 2 8 3 1

19900828

新規登録

東京都中央区日本橋3丁目14番10号

第一製薬株式会社